

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

Abteilung Allgemeine Chirurgie

Direktor: Prof. H. D. Becker

angefertigt unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Schmidt

vorgelegt über das

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

CHEMILUMINESZENZMESSUNGEN BEI DER PHAGOZYTOSE VON LIPOSOMEN DURCH ALVEOLARMAKROPHAGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

SIEGFRIED REMPFER

aus

Bodelshausen

München ~~1988~~

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0075

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

Abteilung Allgemeine Chirurgie

Direktor: Prof. H. D. Becker

angefertigt unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Schmidt

vorgelegt über das

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

CHEMILUMINESZENZMESSUNGEN BEI DER PHAGOZYTOSE VON LIPOSOMEN DURCH ALVEOLARMAKROPHAGEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

von

SIEGFRIED REMPFER

aus

Bodelshausen

München 1988

Gedruckt
mit Genehmigung der
tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof.Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof.Dr.Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Prof.Dr.Dr.habil. H. Petry

Tag der Promotion: 24.Februar 1989

I. Einleitung

II. Die Entwicklung

1. Die Entwicklung

2. Die Entwicklung

3. Die Entwicklung

4. Die Entwicklung

5. Die Entwicklung

6. Die Entwicklung

MEINER FRAU GEWIDMET

1. Die Entwicklung

2. Die Entwicklung

3. Die Entwicklung

4. Die Entwicklung

5. Die Entwicklung

6. Die Entwicklung

III. Die Entwicklung

1. Die Entwicklung

2. Die Entwicklung

3. Die Entwicklung

4. Die Entwicklung

5. Die Entwicklung

6. Die Entwicklung

7. Die Entwicklung

8. Die Entwicklung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literatur	
2.1. Membranen	3
2.2. Membranlipide	5
2.2.1. Membranlipid Phosphatidylcholin	5
2.2.2. Membranlipid Cardiolipin	6
2.3. Micellen	7
2.4. Liposomen	8
2.4.1. Verschiedene Methoden der Liposomen-herstellung	9
2.4.2. Verwendungsmöglichkeiten von Liposomen	11
2.5. Chemilumineszenz	13
2.6. Endozytose	16
2.7. Problemstellung: Phagozytosemessung von Makrophagen mit Chemilumineszenz	19
3. Eigene Untersuchungen	
3.1. Material, Geräte und Methoden	22
3.1.1. Material	22
3.1.2. Geräte	24
3.1.3. Methoden	
3.1.3.1. Isolierung von Alveolarmakrophagen	26
3.1.3.2. Granulozytenisolierung	30
3.1.3.3. Präparation von opsonisiertem Zymosan	32
3.1.3.4. Herstellung von Lysemedium	34

3.1.3.5. Liposomenpräparation und Charakterisierung	34
3.1.3.6. Herstellung carboxyfluoreszinhaltiger Liposomen	37
3.1.3.7. Chemilumineszenzmessung	38
3.1.3.8. Fluoreszenzmikroskopie	40
3.1.3.9. In vivo-Stimulation der Phagozytoseaktivität	41

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Vorversuche	43
3.2.2. Einfluß der Makrophagenzahl auf die Chemilumineszenz	47
3.2.3. Chemilumineszenzkurvenverlauf bei steigender Liposomenmenge	48
3.2.4. Einfluß des Cardiolipingehalts auf die Chemilumineszenz	49
3.2.5. Chemilumineszenz in Abhängigkeit vom Cholesteringehalt	53
3.2.6. Einfluß der Lamellarität auf die Chemilumineszenz	57
3.2.7. Abhängigkeit der Chemilumineszenz von der Größe der Phagozytosepartikel	62
3.2.8. Gegenüberstellung der Ergebnisse bei Alveolarmakrophagen und Vergleich mit Granulozyten	66
3.2.9. Fluoreszenzoptische Darstellung der Liposomenaufnahme	69
3.2.10. Steigerung der Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen	73

4. Diskussion	79
5. Zusammenfassung	87
6. Summary	89
7. Literaturverzeichnis	91
Anlagen	

Abkürzungen

AM	= Alveolarmakrophagen
CDP	= Cytidindiphosphat
CF	= Carboxyfluoreszin
Chl	= Chemilumineszenz
CHOL	= Cholesterin
CL	= Cardiolipin
CMP	= Cytidinmonophosphat
CTP	= Cytidintriphosphat
HMP	= Hexosemonophosphat
LUV	= große unilamellare Vesikel
MAF	= Makrophagen aktivierender Faktor
MDP	= Muramyldipeptid
MLV	= große multilamellare Vesikel
MPO	= Myeloperoxidase
PC	= Phosphatidylcholin
PMA	= Phorbol-Myristal-Acetat
P-Puffer	= Phosphat-Puffer
PS	= Phosphatidylserin
RES	= Reticuloendotheliales System
SCMC	= spontane zellvermittelte Cytotoxizität
SUV	= kleine unilamellare Vesikel

1. Einleitung

Liposomen sind geschlossene, vesikuläre Doppelschichtstrukturen, in denen konzentrische Lipiddoppelschichten wässrige Kompartimente voneinander abgrenzen. Zwischen Membranen von Zellen und Liposomen bestehen Ähnlichkeiten. Deshalb dienen unilamellare Liposomen als Membranmodelle für die Erforschung von Funktion, Aufbau und Aufgaben biologischer Membranen. Neben dieser Verwendung, sowie der Anwendung, Stoffe (z.B. Proteine) in die Membran von Zellen einzubauen, liegt das Hauptinteresse in der Verwendung als "Drug Carrier", wobei die Fähigkeiten Substanzen bzw. Wirkstoffe einzuschließen und damit Transportschwierigkeiten an der Zellmembran zu überwinden, unübertroffen sind. Das besondere Interesse an Liposomen erklärt sich aus Eigenschaften, die in ihrer Summe diese Vesikel von anderen Carriern, z.B. synthetische- und biologische Polymere bzw. Mikrosphären, abheben. Liposomen können relativ einfach aus biogenem Material in breiter Vielfalt, unter Einschluß verschiedenartigster biologisch aktiver Substanzen, hergestellt werden. Liposomen sind wenig oder nicht immunogen. Die problemlose Elimination aus dem Organismus hat einerseits Vorteile, stellt zum anderen aber auch ein großes Problem dar, da Liposomen derart rasch von den phagozytierenden Zellen des RES-Systems abgebaut werden, daß die Zielzellen nicht erreicht werden. Die größte Bedeutung kommt hierbei den Gewebsmakrophagen zu.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Phagozytose von Liposomen unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung mit dem Membranlipid Cardiolipin zu untersuchen, unter Verwendung der Chemilumineszenz als indirektes Meßsystem der Phagozytose. Als ein relativ einfach zu gewinnender Vertreter der Ge-



websmakrophagen wurde der Alveolarmakrophage gewählt.

2. Literatur

2.1. Membranen

Lange vor der Einführung des Elektronenmikroskops entwickelten Darwson und Danielli 1935 ein physikalisch-chemisches Membranmodell, das in seinen Grundzügen auch heute noch Gültigkeit besitzt. Damals war schon bekannt, daß vor allem Phospholipide und Proteine die Hauptbestandteile der Membran sind. Die hypothetische Annahme, es handle sich bei der Zellmembran um eine bimolekulare Phospholipidschicht, deren hydrophoben Pole sich gegenüberstehen, während die äußeren hydrophilen Pole von Proteinen überzogen sind, wurde später anhand elektronenmikroskopischer Befunde bestätigt. Untersuchungen zur Feinstruktur der Membranen von Stoffel (1969) haben ergeben, daß 20 - 80 % der Membranzusammensetzung Lipide sind. Die Plasmamembran, die jede Zelle begrenzt, ist ca. 80 Å dick und wird als Elementarmembran (unit membrane) bezeichnet. Die Grundstruktur der Membran stellt der von Lipiden gebildete Membran-Doppelschichtbilayer dar. Dieses Unit-Membrane-Modell von Bangham (1972) wurde in Arbeiten von Singer und Nicolson (1972), Zwaal et al (1976) etwas abgeändert. Danach sind die Proteine unterschiedlich tief in die Membran eingebettet und können sich auf der Membranebene bewegen und aggregieren. Dieses Modell wird als Fluid-Mosaik-Membran-Modell bezeichnet. Fischer und James (1978) wiesen dieselben Bewegungen für Lipide im Bilayer nach. Der Lipidmolekül-Austausch zwischen innerem und äußerem Layer belegten Kornberg, McConell (1971), Rosemann et al (1975), Rothmann und Dawidowicz (1975). Die drei wichtigsten Komponenten der Bilayerlipide sind: Zwitterionische Verbindungen, saure- und ungeladene Lipide

(Stoffel 1969). Obwohl in den verschiedenen Geweben bezüglich der Membranzusammensetzung große Unterschiede herrschen (Strickland 1973), stellte Derwichian (1964) fest, daß die Phospholipide bezüglich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften gewisse Gemeinsamkeiten aufweisen, so das Vorliegen eines hydrophoben (eine oder mehrere Kohlenwasserstoffketten) und hydrophilen (enthält einen permanenten Dipol) Teils.

Die Verschiedenheit der Membranen erklärt sich in der unterschiedlichen Zusammensetzung. Die Kohlenwasserstoffketten beeinflussen die Membrandurchlässigkeit, da z.B. ungesättigte Phospholipide nicht so eng in den Bilayer eingepackt werden wie gesättigte. So schränkt auch der Gehalt an Cholesterin die Membranpermeabilität ein, da es den Abstand der Fettsäureketten im Bilayer herabsetzt. Dies kann die Ionendurchlässigkeit des Bilayers sowie die Beziehung mit Proteinen beeinflussen, wie Papahadjopoulos und Miller (1967) und auch Van Denen (1972) in ihren Untersuchungen aufzeigen. Spezifische Proteine vermitteln charakteristische Membranfunktionen, z.B. Rezeptoren (vgl. Glycolipide Sharom et al. 1976) oder Kanäle, für deren Aktion die Membranlipide die geeignete Umgebung darstellen.

Mc Intosh (1978) zeigte, daß Cholesterin parallel zu den Alkylketten der Phospholipide im Bilayer eingesetzt wird. dabei liegen die lipophilen Seitenketten des Cholesterins weniger fest im Bilayer als seine hydrophilen Anteile. Hieraus leitet man die stabilisierende Wirkung des Cholesterins auf die Membran ab (Ladbrooke et al. 1968, Oldfield u. Chapman 1972). Membranproteine nehmen ebenfalls Einfluß auf den Bilayer, allerdings nur auf direkte Nachbarmoleküle (Owicky et al. 1978).

Biologische Membranen sind für die Lebensvorgänge aller Or-

ganismen unerlässlich. Die Plasmamembran sichert die Aufrechterhaltung eines konstanten inneren Milieus in der Zelle. Mittels intrazellulärer Kompartimentierung sind Stoffwechselvorgänge erst möglich. Die Membran schafft Individualität der einzelnen Zellen und bietet die Möglichkeit zu intrazellulärem Informations- und Stoffaustausch (Harrison, Roger 1977). Die Umsatzrate von Stoffwechselvorgängen ist abhängig von der Permeabilitätseigenschaft der Membran. Hierbei wird ein Stoffaustausch entlang eines Konzentrationsgefälles als passiver Transport, der energieverbrauchende als aktiver Transport bezeichnet. Die Plasmamembran ermöglicht es, extrazellulären Botenmolekülen in die Zelle einzudringen, oder gibt deren Information weiter. Weiter können Enzyme in der für ihre Reaktionsfolge wichtigen Reihenfolge auf Membranen sitzen und durch diese in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Rezeptoren und Proteine, die die Kontakthemmung des Zellwachstums bedingen, sitzen ebenfalls auf der Membranoberfläche.

2.2. Membranlipide

2.2.1. Membranlipid Phosphatidylcholin

Die Gruppe der phosphathaltigen Lipide werden Phospholipide bzw. Phosphatide genannt. Solche, die neben Phosphat noch Glycerin enthalten, heißen Glycerinphosphatide bzw. Phosphoglyceride. Die Bildung von Glycerinphosphatiden erfolgt beim Säuger im Endoplasmatischen Retikulum (Thiele 1979). Die Bildung (so auch von Lecithin) erfolgt de novo über die Phosphatidsäure. Bei der Synthese eines Phospho-

glycerids aus der Phosphatidsäure muß eine Phosphodiesterbindung geknüpft werden. Dabei wird mit Hilfe von Cytidintriphosphat (CTP) ein energiereiches Zwischenprodukt gebildet. Diese Aktivierung findet entweder am anzuknüpfenden Nicht-Phosphatidylteil oder am Phosphorsäurerest statt. Von den zwei für die Biosynthese der Glycerinphosphatide aus Phosphatidsäure möglichen Wege, wird im Säugetiergewebe als Hauptweg die Phosphatidsäurebildung über den aktivierten Nicht-Phosphatidylteil (z.B. Cholin) beschriftet.

Im Falle des Lecithins (Phosphatidylcholin) bedeutet dies, daß zunächst Cholin mit Hilfe von ATP, Magnesium-Ionen und einer Cholin kinase phosphoryliert wird. In einem weiteren Schritt wird das phosphorylierte Cholin mit Hilfe von CTP unter Diphosphatabspaltung zu einem CDP-Ester aktiviert. Im nachfolgenden Syntheseschritt reagiert der CDP-Ester mit 1,2-Diacyl-sn-Glycerin. 1,2-Diacyl-sn-Glycerin entstand aus Phosphatidsäure, unter der Bildung eines Diacylphosphatids und der Abspaltung von CMP, mit Hilfe einer Phosphatidsäure-Phosphatase. Die Reaktion des CDP-Esters 1,2-Diacyl-sn-Glycerin wird katalysiert von der Cholinphosphotransferase, wobei es dann zur Abspaltung von CMP kommt, was zur Bildung von Lecithin führt.

Die Phospholipide tragen hydrophile und hydrophobe Gruppen. Diese amphiphilen Eigenschaften befähigen die Phospholipide zum Aufbau von Lipiddoppelschichten in biologischen Membranen. Phosphatidylcholin besitzt eine positive und negative Ladung (Zwitterion) und erscheint somit bei physiologischem pH-Wert neutral.

2.2.2. Membranlipid Cardiolipin

Cardiolipin wird mit Hilfe von zwei aktivierten Phosphatidsäuren synthetisiert, die mit den beiden HOH_2C -Gruppen des Glycerins verknüpft werden. Die Aktivierung der Phosphatidsäuren erfolgt über CTP (Cytidintriphosphat).

Cardiolipin kommt in Pflanzen, Mitochondrien und Bakterien vor. Für Bakterienmembranen ist Cardiolipin charakteristisch. Im Säugerorganismus wurde Cardiolipin erstmals aus Herzmuskelzellen isoliert. Es stellt das Leitlipid der inneren Mitochondrienmembran dar, in der sich die Enzyme der Atmungskette befinden. Die innere Mitochondrienmembran besteht zu 80 % aus Protein und zu 20 % aus Lipid. Cardiolipin macht alleine 20 % der Gesamtlipide der inneren Mitochondrienmembran aus (Karlson 1980).

Es wird vermutet, daß Cardiolipin zur auffallend geringen Ionendurchlässigkeit der Membran beiträgt. Dies ist für die Funktion der in dieser Membran sitzenden Redoxkette zum Aufbau und Erhalten eines elektrochemischen Gradienten wichtig. Die Fettsäurereste des Lipids werden zu 80 % von Linolsäure gebildet. Die Bildung von Cardiolipin aus zwei Phosphatidsäuren stellt die wichtigste Lipidsynthese in den Mitochondrien dar. Als Ausgangsmaterial für die Synthese dienen Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin, die im Endoplasmatischen Retikulum gebildet werden und über einen speziellen Transportmechanismus in die Mitochondrien gelangen. Cardiolipin (Bisphosphatidylglycerin) ist ein 2-fach negativ geladenes Phospholipid im Gegensatz zum neutralen Phosphatidylcholin.

2.3. Micellen

Stark polare amphipathische Lipide sind in der Lage, in

wässriger Phase schon bei geringen Konzentrationen molekulardisperse Lösungen zu bilden. Nach Überschreiten der Kritischen Micellarkonzentration bilden sich Micellen. Diese stehen mit den monomer gelösten Molekülen im dynamischen Gleichgewicht (Thiele 1979). Die kritische Micellarkonzentration, welche temperaturabhängig ist, stellt eine charakteristische Größe des jeweiligen Lipids dar. Unterhalb der kritischen Micellentemperatur bilden sich keine Micellen mehr. Weiter ist der pH-Wert von großer Bedeutung bei anionischen, amphipathischen Lipiden. Bei fortlaufender Senkung des pH-Wertes werden mehr und mehr anionische Gruppen protoniert, bis keine Ladung mehr vorhanden, und somit keine Micellenbildung mehr möglich ist. Die mittlere Aggregationszahl stellt neben der kritischen Micellarkonzentration ebenfalls eine charakteristische Größe eines Lipids dar. Die mittlere Aggregationszahl (Anzahl der Monomere in einer Micelle) liegt zwischen 2 und 100. Die meist sphärisch gebauten Micellen, mit einem Durchmesser von 5 - 10 nm, sind so aufgebaut, daß die polaren Köpfe die Oberfläche bilden, die unpolaren Schwänze hingegen nach innen gerichtet sind. Es wird hierbei von hydrophoben Bindungen gesprochen, da die Anordnung in Folge Abstoßung hydrophober Gruppen durch die wässrige Phase entsteht.

2.4. Liposomen

Die Bezeichnung "Liposom" wird erstmalig von Sessa und Weissman 1968 eingeführt. Sie wurden als Membranmodelle vorgeschlagen, da sie mit den biologischen Membranen viele Gemeinsamkeiten haben. Bereits 1967 zeigte Small, daß sich in wässrigen Salzlösungen, in Gegenwart von Phospholipiden,

Lipiddoppelschichten bilden. Diese Doppelschichten bilden sich jedoch nur, wenn die Lipide im flüssigen- kristallinen Zustand vorhanden sind (Dervichian 1964).

Liposomen sind kugelförmige Gebilde aus einer oder mehreren konzentrischen Lipidmembranhüllen, die eine wässrige Phase umschließen. Sie variieren in der Größe von 25 nm bis zu mehreren μm . Nach der Definition der New York Academy of Science, werden sie eingeteilt in große multilamellare Vesikel (MLV: Größe 0,1 - 5 μm), kleine unilamellare Vesikel (SUV: Größe 0,02 - 0,005 μm) und große unilamellare Vesikel (LUV: Größer als 0,06 μm).

2.4.1. Verschiedene Methoden der Liposomenherstellung

Bangham et al. befassten sich erstmals 1965 mit der Herstellung von Lipidvesikeln, die sie als "swollen phospholipids" bezeichneten. Dem Prinzip nach gibt es drei Methoden zur Liposomenherstellung:

- a. Mechanische Methoden
- b. Verwendung organischer Lösungsmittel
- c. Herstellung mittels Detergenzien

a. Mechanische Methoden

Kleine multilamellare und homogene Vesikel stellten 1979 Olson et al. her, indem sie eine Lösung multilamellarer, inhomogener Vesikel (Bangosomen) durch eine Polycarbonatmembran definierter Porengröße pressten (Extrusionsmethode). Von Huang (1969) und Johnson et al. (1971) wird die Herstellung sehr kleiner (25 nm), unilamellarer Liposomen aus MLV mittels Ultraschallmethode beschrieben.

Dearden et al. kombinierten die Ultraschall- mit der Polycarbonatfiltrationsmethode. Unilamellare Vesikel 30 - 50 nm stellten Barenholtz et al. mittels der sogenannten "french press" her. Unter hohem Druck werden hierbei "Bangosomen" beim Durchtritt durch Öffnungen bestimmter Lumenweite aufgebrochen. Beim Durchtritt wirken Scherkräfte, die zur Entstehung unilamellarer Vesikel bestimmter Größe führen.

b. Verwendung organischer Lösungsmittel

Deamer und Bangham entwickelten 1976 die Ätherverdampfungs- methode. Hierbei wird eine Lösung der Lipide in Äther langsam in einen angewärmten Puffer gespritzt, wobei der Äther verdampft und im Puffer unilamellare Liposomen von ca. 130 nm entstehen. Durch Modifizierung der Ätherinjektions- methode erhielten Kremer et al. 1977 ebenfalls unilamellare Liposomen, die in ihrer Größe (15 - 50 nm) variierbar waren. Batzri und Korn veränderten die Methode nach Deamer und Bangham zur Ethanolinjektionsmethode. Iräuble und Grell (1971) stellten als erste asymmetrische Liposomen her. Hierbei kommt es über die Vorstufe von inversen Micellen in organischer Lösung, durch Überzug mit einem Monolayer, zum Übertritt in die wässrige Phase. Dabei entstehen asymmetrische Bilayer. Mit der "reverse phase evaporation" nach Szoka und Papahadjopoulos (1978) entstehen uni- und oligo- lamellare Liposomen. Hierbei werden organische Lipidlösungen zu einer wässrigen Phase gebracht, beschallt und das Lösungsmittel verdampft.

c. Herstellung mittels Detergenzien

Unter Zugabe von Desoxycholat zu den Phospholipiden und anschließender Entfernung des Detergens, durch Gelfiltration erhielten Enoch und Strittmatter 1978 inhomogene große Li-

posomen von ca. 100 nm. Bei der Verwendung von Cholat erhielten Brunner et al. 1976 relativ kleine Liposomen (ca. 30 nm). Mittels schneller Dialyse über sogenannte "hollow fibers" (entspricht etwa der Gelfiltration), erhielten Rhoden und Goldin 1979 Liposomen, die sie zwischen 34 - 128 nm variieren konnten. Die Methode der schnellen und kontrollierten Dialyse nach Milsmann et al. bietet die Möglichkeit, in ihrer Größe variable, homogene, unilamellare Liposomen herzustellen. Die Größenunterschiede werden mittels verschiedener Emulgatoren erreicht.

2.4.2. Verwendungsmöglichkeit von Liposomen

Unilamellare Vesikel stellen ein gutes Untersuchungsobjekt für die Erforschung von Funktion, Aufbau und Aufgabe biologischer Membranen (Wilshut et al. 1981, Miller u. Dahl 1982, Ohki 1982, Düzgünes u. Ohki 1981, Sun et al. 1979) dar. Über die Fusion der Vesikelmembran mit biologischen Membranen ist es möglich Proteine in diese einzubauen, Substanzen ins Zellinnere zu bringen, oder Zelldefekte zu beheben. Neben diesen Anwendungen fand seit Ende der 60er Jahre ihr Gebrauch als Träger für eine Vielzahl von Arzneimitteln zunehmende Bedeutung. Eine Übersicht über die Zahl und Art der verwendeten Wirkstoffe findet sich bei Puisieux und Benita (1982).

Aus zahlreichen Veröffentlichungen haben sich folgende Vorteile für die Verwendung von liposomal verabreichten Wirkstoffen herauskristallisiert:

- Verbesserung pharmakokinetischer Parameter wie Gewebeverteilung und Eliminationsrate

- Geringe Toxizität (Alving 1979)
- Permeabilitätserhöhung und Überwindung von Resistenzen
- Verminderung der therapeutischen Dosis (Alving 1982)
- Überwindung der schlechten Wasserlöslichkeit
- Einsatz von Liposomen als Depot- Arzneiform
- Aufnahme liposomal gebundener Substanzen über Lipidtransfer

Die Liposomen finden Anwendung in der Tumorthherapie und in der Immunologie. In der Immunologie dienen Liposomen als Modell für natürlich ablaufende Immunreaktionen, wie Antikörperbildung, Komplementstimulierung, sowie Regulierung der humoralen und zellulären Immunreaktion (Okada et al. 1983). Obwohl Liposomen in der für in vivo Versuche typischen Lipidzusammensetzung nicht immunogen wirken, wurde gezeigt, daß sie als leistungsfähige Adjuvantien verwendet werden können (Allison u. Gregoriadis 1974).

Seit Ende der 70er Jahre befaßte sich eine Gruppe um Fidler sehr ausführlich mit der Beeinflußung des Immunstatus von Alveolarmakrophagen mittels liposomal eingekapselter Immunstimulantien (MAF, MDP). Sie stellten fest, daß MLV mit einer Lipidzusammensetzung von PC : PS (7 : 3) ideal für den Transport sind (Fidler u. a. 1980). Sie konnten feststellen, daß so eingekapselte MAF und MDP (1981) nach intravenöser Injektion sehr viel wirksamer sind als die freien Substanzen.

Eine Übersicht über die Erfolge und Erfahrungen beim Einsatz von Liposomen zum Transport von genetischem Material finden sich bei Fraley und Papahadjopoulos (1982) und Papahadjopoulos (1982). Den genannten Anwendungsmöglichkeiten stehen allerdings auch eine Reihe von bisher ungelösten

Problemen gegenüber:

- Iv. applizierte Liposomen können das Kapillarsystem in den meisten Organen nicht verlassen und können so nicht in die Zielgewebe gelangen.
- Phagozytierende Zellen des RES bauen Liposomen ab, bevor diese die Zielzelle erreicht haben.
- Interaktionen mit Plasmabestandteilen verändern die Vesikel in ihrem Freisetungsverhalten.
- Ungelöst ist die Frage, wie stabil Substanzen in Liposomen eingeschlossen bleiben, bis die Vesikel am Wirkort angekommen sind.

Derzeit kommen als Zielzellen liposomal eingeschlossener Wirkstoffe neben den Hepatozyten vor allem Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen in Frage.

2.5. Chemilumineszenz

Als Biolumineszenz bezeichnete man die Aussendung von kaltem Licht als eine Form der Lebensäußerung, die in der Biologie lange als Kuriosum einiger leuchtender Insekten und zahlreicher mariner Lebewesen bekannt war.

Das Grundprinzip aller solch gearteter Erscheinungen ist das Freiwerden von Energie in Form von Licht beim Zurückfallen von energetisch angeregten Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau. Im Jahre 1972 beobachtete Allen, daß PMN's (polymorphnuclear leukocytes) während der Phagozytose Licht aussenden. Diese Photonen werden erzeugt, wenn die, während des "respiratory burst" und des "mikro-bial killing" entstehenden Moleküle (z.B. O_2 -Radikal) (Rosen, Klebanoff 1977), aus dem angeregten Zustand wieder

in den Normalzustand zurückkehren (Cheson et al. 1976, Fischer, Staudinger 1981).

"Respiratory burst"

Störungen an der Membran können den "respiratory burst" auslösen, der durch einen starken Anstieg des O_2 -Verbrauchs und der Aktivität im HMP(Hexosemonophosphat)-Weg gekennzeichnet ist (MC-Phail et al. 1983). Der aufgenommene Sauerstoff wird über eine NADPH abhängige Oxidase zu Superoxid reduziert. Das extrem reaktive Superoxid-Radikal kann im NBT-Test oder in der Chemilumineszenz gemessen werden. Superoxid, das aus der Phagozytenvakuole entweicht, wird mit der SOD(superoxid dismutase) zu H_2O_2 umgewandelt, das wiederum durch das Katalase/Gluthathion-Peroxi-dase/Gluthathion-Reduktase-System entgiftet wird. Das bei den Reaktionen entstehende $NADP^+$ wird im HMP-Weg regeneriert.

"Microbial killing"

Dieser Vorgang ist in seinen Einzelheiten noch nicht vollständig geklärt. Es werden zwei Systeme unterschieden.

a. Sauerstoffabhängige Systeme: MPO (Myeloperoxidase)- abhängige Systeme, die H_2O_2 (aus dem "respiratory burst"), ein Halogen und einen sauren pH benötigen. MPO-unabhängige Systeme, die zur Bildung von verschiedenen Sauerstoffverbindungen (H_2O_2 , O_2 , "singlet oxygen" 1O_2 eine Verbindung die für jedes biologische System tödlich ist) führen. Alle angeführten Sauerstoffverbindungen können über eine Reihe von Reaktionen zur Photonenabgabe beitragen, die ihrerseits im Chemilumineszenztest gemessen werden kann (Babior et al. 1973)

b. Sauerstoffunabhängige Systeme: Lysozym, Lactoferin, Senkung des pH, nukleäre Histone, Proteasen, kationische Proteine.

Über den genauen Wirkungsmechanismus, der zur Entstehung der Chemilumineszenz beiträgt, herrscht im Detail jedoch noch Unklarheit. Es gilt als gesichert, daß nicht nur die direkte Sauerstoffreduktion, sondern auch das $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}$ System an der Lichtemission beteiligt ist (Zgliczynski 1985). Fischer wies auch auf chemische Reaktionen hin, wie die Synthese von Prostaglandinen. Dieser Vorgang befaßt sich nicht direkt mit der Bildung bakterizider Substanzen, führt aber trotzdem zur Aussendung von Photonen. Die ausgesandten Lichtmengen sind insgesamt jedoch gering und damit als Parameter für quantitative Phagozytosemessungen nur unzureichend geeignet.

In Luminol (5 - amino- 2,3- dihydro- 1,4 phtalazinedione) fanden Allen und Loose (1976) eine Substanz, welche die Emission von Licht 100 - 1000-fach verstärkt (eigentliche Chemilumineszenz). Die Oxidation von Luminol, durch reaktive Sauerstoffspezies, führt zur Bildung von α -Aminophthalation mit angeregten Elektronen. Die dabei freiwerdende Energie wird als Licht bei 425 nm ausgesandt. Dies alles zeigt, daß die Luminol-abhängige Chemilumineszenz das Resultat einer komplizierten Serie von Reaktionen mit allen von Phagozyten produzierten Sauerstoffspezies darstellt. Dennoch ist der exakte Reaktionsweg unbekannt, scheint aber Myeloperoxidase-abhängig zu sein, was anhand MPO-defizitärer Granulozyten gezeigt wurde. Diese versuchen durch eine erhöhte Bildung von Sauerstoffradikalen den Mangel zu kompensieren und dennoch konnte keine Luminol-abhängige Chemi-

lumineszenz gemessen werden (De Chatelet 1982)

Während Chemilumineszenzmessungen bei Granulozyten und Blutmonozyten schon sehr intensiv untersucht waren, befassten sich Beall et al. 1977 mit Chemilumineszenzmessungen bei humanen Alveolarmakrophagen. Allen und Loose (1976) und Milles et al. (1972) machten Untersuchungen an Alveolar- und Peritonealmakrophagen von Versuchstieren. All diese Zellen zeigten Chemilumineszenz, jedoch in geringerem Ausmaße als Granulozyten. 1985 stellten Dean und Jessup fest, daß der Myeloperoxidase-abhängige Mechanismus bei den Makrophagen eine untergeordnete Rolle spielte und dessen Wirkung teilweise durch die Katalase und SOD ersetzt wird.

2.6. Endozytose

Man unterscheidet drei Formen der Endozytose.

Bei der Pinozytose (von griechisch pinein = trinken) wird unspezifisch extrazelluläre Flüssigkeit in Form winziger Tröpfchen aufgenommen. Dabei hüllt die sich einstülpende Membran die Tröpfchen in Vesikel von etwa $0,1 \mu$ Durchmesser. Mittels dieser Flüssigkeiten gelangen auch Ionen und kleinere Moleküle in die Zelle. Es handelt sich dabei um eine zufällige Aufnahme. Pinozytose findet bei vielen Zellen fortwährend statt.

Im Gegensatz dazu ist die rezeptorgekoppelte Endozytose ein außerordentlich spezifischer Transportprozess. Hierbei fungieren Membranproteine als Rezeptoren mit einer Bindungsstelle für einen bestimmten Liganden (Protein oder winziges Partikelchen). So ist gewährleistet, daß nur ganz gezielt Substanzen aus der extrazellulären Suppe aufgenommen wer-

den.

Die Phagozytose (von griechisch phagein = fressen) stellt den phylogenetisch ältesten und wichtigsten Resistenzmechanismus dar. Man versteht darunter die Aufnahme und Vernichtung fremder inerte Partikel oder Mikroorganismen (Rolle u. Mayr 1978). Der Phagozytose der Makrophagen kommt insofern eine besondere Rolle zu, da diese Zellen ein unersetzbares Bindeglied zur spezifischen Immunabwehr darstellen. Sie deponieren antigenes Material in einer besonders immunogenen Form an der Zelloberfläche, wo es durch Zell- zu Zellkontakte den T-Helferlymphozyten präsentiert wird. Zur Phagozytose sind folgende Zellen befähigt:

Die polymorphkernigen Phagozyten und hier in erster Linie die neutrophilen Granulozyten und in weit geringerem Maße die eosinophilen Granulozyten. Die mononukleären Phagozyten, sprich Gewebsmakrophagen und Blutmonozyten, die in ihrer Einheit das RES-System (reticuloendotheliales System) repräsentieren. Der Vorgang der Phagozytose wird in folgende drei Schritte gegliedert (Stünzi und Weiss 1982):

1) Adhäsion: Die Anheftung des Phagozytosepartikels an den Phagozyten wird durch Opsonisierung, d. h. durch Anlagerung von Opsonin an den Partikel wesentlich erleichtert. Als Opsonine fungieren die Immunglobuline, und hier in der Hauptsache IgG, während IgM, IgE und IgA eine untergeordnete Rolle spielen, sowie der Komplementfaktor C3b (Dean u. Jessup 1985). Entsprechend besitzen die Phagozyten Rezeptoren für das Fc-Stück von IgG und das Komplementspaltprodukt C3b. Neben der Opsonisierung spielen beim Phagozytosevorgang Oberflächeneigenschaften von Phagozytosepartikeln und Phagozyt wie Hydrophobizität, Ladung und chemische Zusammensetzung (Silverstein et al. 1977, Besterman und Low

1983) eine wichtige Rolle. Bei der Phagozytose bestimmter Partikel, wie z.B. Latex (Silverstein et al. 1977), die auch ohne vorherige Opsonisierung stattfinden kann, wird zum einen diesen unspezifischen Oberflächenmechanismen eine wichtige Rolle zugesprochen, zum anderen mehrten sich aber die Hinweise dafür, daß auch hier zum Teil spezifische Rezeptoren beteiligt sind (Dean und Jessup 1985).

2) Inkorporation: Die Inkorporation des Phagozytosepartikels wird über die Ausbildung von Pseudopodien bewerkstelligt. Richtung und Ausmaß der Membranbewegung wird durch die ständige Verfügbarkeit von Rezeptoren an der Membranoberfläche in der Art eines Reißverschlußmechanismus gesteuert (Stünzi und Weiss 1982).

3) Abtötung und Abbau: Der Abbau des als Phagosom in der Zelle vorliegenden Partikels wird durch die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen eingeleitet. Intrazelluläre mikrobizide Mechanismen lassen sich in sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige einteilen (Vorlaender 1983):

-sauerstoffabhängige Mechanismen: Die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ist begleitet von einem sprunghaften Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, dem sogenannten "respiratory burst". Im Stoffwechselgeschehen der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser werden durch partielle Reduktion Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal ($\cdot OH$) gebildet. Interaktionen zwischen diesen Molekülen führen auch zur Bildung von Singulett-Sauerstoff 1O_2 . Die mikrobizide Wirkung von Wasserstoffsuperoxid wird bei neutrophilen Granulozyten durch das Enzym Myeloperoxidase wesentlich gesteigert, das

die Oxidation von Halogenionen in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxid katalysiert. Anschließend kommt es zur Halogenierung der Mikroorganismenzellwand. Dieser Myeloperoxidase-abhängige Mechanismus spielt bei Makrophagen jedoch eine untergeordnete Rolle, die Wirkung wird teilweise durch Katalase ersetzt (Dean und Jessup 1985). Sowohl bei neutrophilen Granulozyten als auch bei Makrophagen bewirken Superoxidanion, Hydroxylradikal und Singulett-sauerstoff Myeloperoxidase-abhängig eine starke Mikrobizidie.

-sauerstoffunabhängige Mechanismen: Als sauerstoffunabhängige mikrobizide Faktoren werden der saure pH-Wert des Phagosoms und die Wirkung von Lysozym angeführt. Die bakteriostatische Wirkung von Laktoferrin und kationische Proteine, die autolytische Bakterienzellwandenzyme aktivieren, unterstützen ebenfalls diese Mechanismen.

2.7. Problemstellung: Phagozytosemessung von Makrophagen mit Chemilumineszenz

Alle heute verwendeten Phagozytostests (direkte und indirekte) sind nicht in der Lage, den komplexen Phagozytosevorgang als Ganzes zu erfassen. Sie erfassen direkt oder indirekt nur Teile des Gesamtgeschehens.

Allen folgerte 1972, daß die Chemilumineszenz als indirekter in vitro Phagozytostest eine Aussage über die Phagozytoserate, Zellaktivität und den Zellmetabolismus zulasse. Dies ist kritisch zu betrachten, da die Chemilumineszenz keinen eigentlichen Parameter für den oxidativen Metabolismus des Phagozyten darstellt, obwohl während des Phagozytosevorgangs über das Superoxidanion eine Reihe von Sauer-

stoffradikalen entstehen, die nach Koppelung an Luminol als Lichtcounts gemessen werden können. Der oxidative Mechanismus spielt die dominierende Rolle in der bakteriziden Kapazität des Phagozyten (Smith 1982).

De Chatlett wies 1982 die völlige Abhängigkeit der Luminol-vermittelten Chemilumineszenz von dem Enzym MPO nach. Dies macht die Chemilumineszenz eher zu einem Test für den Nachweis der MPO-Aktivität. DeLuca und McElroy schrieben 1986, daß die Luminol-abhängige Chemilumineszenz vorwiegend, aber nicht nur, von der MPO abhängig ist. Rosen (1979) spricht diesem Enzym eine überragende Bedeutung für die Abtötung von Mikroorganismen zu. Die genauen biochemischen Abläufe bei der Chemilumineszenz sind bis heute noch unklar (Zgliczymski 1985).

Große Unklarheit besteht darüber, ob Chemilumineszenz auch ohne Partikelaufnahme möglich ist und wenn eine Partikelaufnahme stattfindet, ob stets eine Chemilumineszenzantwort auftritt. PMA stimuliert die Phagozyten anscheinend ohne Partikelaufnahme zur Chemilumineszenz. Hierbei wird jedoch die Entstehung von Membraneinstülpungen "Pseudophagosomen" diskutiert. Miles et al. fanden 1979, daß die Chemilumineszenzantwort vor der Partikelaufnahme auftritt. Chari-Bitron et al. folgerten 1983 aus ihren Versuchen, daß Chemilumineszenz in der Zeit der Adhärenz und der Invagination des zu phagozytierenden Partikels auftritt. Diese Vorgänge sind ihrerseits jedoch Grundvoraussetzung für den Gesamtablauf der Phagozytose. Tsan fand 1977 eine Chemilumineszenzantwort bei der Phagozytose von Latexpartikeln durch neutrophile Granulozyten, nicht jedoch beim Einsatz von Kaninchen-Alveolarmakrophagen.

All dies zeigt die Problematik der Interpretation von Phagozytostests, die einerseits nur ganz spezielle biochemi-

sche Vorgänge messen, andererseits als Kriterium für die allgemeine Phagozytosefähigkeit herangezogen werden.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material, Geräte und Methoden

3.1.1. Material

Substanzen zur Liposomenherstellung:

Cardiolipin (aus Rinderherzen) CH 37F-8410 Fa. Sigma USA

L- α Phosphatidylcholin aus Eigelb CH 67F-8410 Fa. Sigma USA

Cholesterin (2 x aus Methanol umkristalisiert) 41F-7415

Fa. Sigma St. Louis, Mo USA

Carboxyfluoreszin : Fa. Kodak BRD

CgE₄ (N - Octyltetraoxyethylene) : P 1120 Bachem-Feinchemikalien AG , Bubendorf CH

OG (Octylglucosid) : Calbiochem. BRD

Na Cholat : Fa. Serva, Heidelberg BRD

Puffer:

PbS Dulbeco mit Ca²⁺, Mg²⁺ : Biochrom KG Berlin
modifizierter Puffer mit 0,1 % Glc.

PbS Dulbeco ohne Ca²⁺, Mg²⁺ : Biochrom KG Berlin
modifizierter Puffer mit 1 mmol EDTA (0,186 g)

P-Puffer: 10 mM pH 7,4 und einer Osmolarität von ca. 300 mOsm hergestellt aus 150 mmol NaCl (87,66 g) 10mmol Na₂ PO₄ x H₂O (17,80 g) und 20 ml HCl auf 10 l Aqua bidestillata

P-Puffer: 260 mOsm hergestellt aus 3,5 g NaCl, 0,89 g Na₂ HPO₄ x H₂O und 0,95 ml 1 normale HCl auf 500 ml H₂O

Für die Granulozytenisolierung verwendete Reagenzien:

Histopaque^R-1077 und Histopaque^R-1119

Fa. Sigma St. Louis USA

NaCl 0,9 % : B.Braun, Melsungen AG

NH₄Cl (Amoniumchlorid) Art.-Nr. 1145 Fa. E.Merk BRD

K HCO₃ (Kaliumhydrogencarbonat) Art.-Nr. 4854

D(+) Glucose M = 198,17 g: E. Merck Ag, Darmstadt BRD

Für die Zellbestimmung am Microcellcounter:

Isotonlösung : Coulter Electronics GmbH, Krefeld BRD

Cello-lyze³ Dilab Karlsruhe BRD (Hämolysereagens bei der
Leukozytenzählung mit einem Zusatz von Hämoglobin

Phagozytosepartikel:

Zymosan A von *Sacharomyces cervisiae* 81F-7716 Fa. Sigma USA

Latex Beads 10 % Lösung

0,1 u 105F-02641

0,6 u 28C-0053

1,0 u 17F-0003 F. Sigma St. Louis USA

Zur Chemilumineszenzverstärkung wurde 2×10^{-4} molares Luminol verwendet, um eine 2×10^{-4} molare Lösung zu erhalten wurde das von der Fa. Lumac St. Paul Schaesberg Niederlande gelieferte 10^{-3} molare LumanolTM-100 im Verhältnis 1 : 5 verdünnt.

Gelmaterial für die Säulenchromatographie:

Sephadex LH 20

Sepharose 4B Cl : Fa. Pharmacia Fine Chemicals,
Uppsala Schweden

Narkosemittel:

Rompun^R- 2 % Lösung : Fa. Bayer, Leverkusen BRD

Ketanest^R- 5 % Lösung : Parke Davis & Company, Berlin BRD

Immunstimulantien:

PIND-avi (aus attenuiertem Avipoxvirus-gallinae Stamm HP-1
E.coli- 08 Lysat (Autolysierung + alkalische Hydrolyse
6,4 mg/ml Proteinmenge)

E.coli- 08 Lysat + Lysozym (1000 E/ml, 4,04 mg/ml Protein-
menge) zur Verfügung gestellt vom Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärzt-
lichen Fakultät der Universität München

Echinacin^R-Ampullen 0,1g/2ml: Madaus & Co, Köln BRD

Versuchstiere:

Wistar-Kyoto Ratten, männlich mit einem Gewicht zwischen
220 - 700 g von der Tierversuchsanstalt Ivanovas Kiss-
legg/Allgäu, Haltung in Standardkäfigen (Makrolon Typ III
820 - 900 cm², 15 cm Höhe) bei einer Temperatur von 22°C
und einer Luftfeuchtigkeit von 55 %, Fütterung Altromin/Pe-
letts und Wasser ad Libitum.

3.1.2. Geräte

6 - Kanal-Biolumat LB 9505, Fa. Berthold Wildbad BRD kom-
biniert mit Apple II Computer zur Auswertung der Daten

Zellcounter Sysmex : Digitana AG, Hamburg BRD

Präzisionsglasspritzen : Fa. Hamilton, Bonaduz CH

Liposomenpräparationsgeräte:

Mini-Lipoprep

Lipoprep TYP GD1 : Fa. Dianorm, Rüschlikon CH

Extruder : Lipex Biomembranes Inc. Vancouver Kanada

Polycarbonatmembranen (Durchmesser 25 mm, Porenweite 100 - 800 nm) : Nucleopor GmbH, Tübingen BRD

Chromatographiesäule 300 mm x 13 mm

Rotationsverdampfer, Rotavapor RE Typ W 240 N : Fa. Büchi
CH

Lyophilisator Beta I 1104 : Fa. Christ. Osterode BRD

Nanosizer : Fa. Coulter Electronics Harpenden Herts GB

pH-Meter, Digitalmeter Digi 610 : Fa. WTW, Weilheim BRD

3.1.3. Methoden

3.1.3.1. Isolierung von Alveolarmakrophagen

Bei der Ratte standen zwei Techniken zur Verfügung (DeLuca 1978). Zum einen die Isolierung der Zellen aus zerkleinertem Lungengewebe, zum anderen die Gewinnung über Lungenspülungen. Letztere Methode hat sich als günstiger erwiesen, da hier die Verunreinigung mit roten Blutzellen in der Mehrzahl der Fälle nicht auftritt oder sehr gering ist. Der Gehalt an roten Blutzellen ist weiterhin von der Spültechnik abhängig. Spülungen über ein Bronchoskop, wie beim Menschen (Tarrito, Golde 1979), sind bei der Ratte nicht beschrieben. Für die Wahl der Ratte als Versuchstier ist neben Kostengründen die Tatsache maßgebend, daß bei Ratten-spülungen im Gegensatz zu Meerschweinenspülungen, tier- artlich bedingt, nur vernachlässigbar geringe Verunrei- nigungen mit Granulozyten auftreten. Um die Zellen besser aus dem Zellverband lösen zu können, wurde als Spülflüssig- keit PbS-Puffer ohne Calcium und Magnesium, mit 1 mmol Na- trium-EDTA (0,186 g/500 ml) verwendet.

Genaueres Vorgehen: Die Tiere wurden durch eine intramuskuläre Injektion von Rompun^R und Ketanest^R in einer Do- sierung von 5 mg/kg (KG) Rompun^R und 100 mg/kg(KG) Ketanest^R als Mischspritze anästhesiert. Nachdem man sich durch Prüfen der Lid- und Zwischenzehenreflexe von der Tiefe der Narkose überzeugt hatte, wurde die Ratte in Rückenlage auf einer Korktafel an den Extremitäten fixiert. Die Haut im Brust- und Bauchbereich wurde durchtrennt und abgetragen. Nach Eröffnen der Bauchhöhle und Anlegen von Entlastungsschnitten, wurden Bauchaorta sowie V.cava cauda-

lis durch seitlich lagern des Darmtraktes freigelegt. Das Durchtrennen der Gefäße mit einem Scherenschlag führte zum vollständigen Entbluten der Tiere. Das Zwerchfell wurde vorsichtig im Bereich des Brustbeins durchtrennt, was zum Kollabieren der Lunge führte. Zur Eröffnung des Brustraumes wurden die Rippen beiderseits entlang der Knorpelbrücken durchtrennt und das Brustbein entfernt. Aorta und V.cava caudalis wurden im Brustraum nochmals durchtrennt, und die Verbindungen zwischen Lunge, Zwerchfell und Brustwand gelöst, um das vollständige Entbluten sowie das optimale Kollabieren der Lunge zu erreichen. Es folgte nun das Freilegen der Trachea. Hierzu entfernte man die Haut im Halsbereich mit einem Scherenschlag, Thymus und Halsmuskulatur wurden ebenfalls entfernt. Die so freigelegte Trachea wurde durch Spreizen der Schere von ihrem Untergrund gelöst. Eine kleine Inzision in Höhe des Kehlkopfes diente dazu, den Plastikteil einer Braunüle mit seiner Spitze bis vor die Hauptbronchen zu bringen. Um ein Herausrutschen der Braunüle während des Spülvorgangs zu verhindern, wurde sie mittels Sandpapier angeraut und mit einem Faden fixiert. Die Spülung erfolgte stets 10 Minuten nach dem Ausbluten der Tiere mittels Natrium-EDTA-haltigem (1 mmol/l) PbS-Puffer ohne Calcium und Magnesium. Hierzu wurde mit einer 5 ml Einwegspritze langsam die Spülflüssigkeit in die Lunge eingebracht. Die Lunge mußte sich dabei langsam aufdehnen und durfte keinesfalls überdehnt werden. Desgleichen durfte keine Luft mitinjiziert werden. Die eingebrachte Spülflüssigkeit wurde nach manueller Massage des Lungengewebes wieder aspiriert. Nach 2 - 3 maligem Wiederholen des Vorgangs wurde die Spülflüssigkeit in ein spezielles Röhrchen für Zellzentrifugation gebracht. Es erfolgte eine viermalige Wiederholung des gesamten Vorgangs, mit jeweils 5 ml. Die

Spülflüssigkeiten wurden in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt.

Die folgenden Schritte zur Makrophagenisolierung sind anhand eines Flußdiagramms veranschaulicht:

Lungenspülflüssigkeit

Zentrifugation bei 20°C und 120 x g für 7 min.

Überstand verwerfen

Pelett in 20 ml PbS-Puffer mit Ca^{2+} Mg^{2+} und 0,1 % Glc.re-suspendieren.

Überstand verwerfen

Pelett in 500 μl PbS-Puffer mit Ca^{2+} , Mg^{2+} und 0,1 % Glc. re-suspendieren.

Zellzahlbestimmung:

Die Gesamtzahl der gewonnenen Makrophagen wurde mit der Zählkammer-Methode bestimmt. Sie hatte den Vorteil, daß die Zahl lebender Zellen bestimmt werden konnte, was bei der Messung der Phagozytose sehr wichtig war, zumal bei der Lungenspülung infolge mechanischer Einflüsse eine unterschiedliche und oft recht hohe Zahl an toten Zellen enthalten war, im Durchschnitt lagen sie bei 5 - 8 %.

10 μl Zellsuspension und 90 μl Trypanblau (0,16 %) wurden mittels Eppendorf-Pipette gut gemischt. Nach Verwerfen der ersten 2 - 3 Tropfen wurde die Neubauer-Zählkammer

gefüllt. Es wurden 4 Großquadrate zu je 16 Kleinquadraten ausgezählt. Die Werte wurden addiert und ein Mittelwert gebildet.

Die Zellzahl (X) ergab sich wie folgt:

Mittelwert aus den 4 Großquadraten $\times 10^4 \times$ Verdünnung (1 : 10) = Zellen /ml. Die Angabe erfolgte als Vielfaches von 10^6 /ml. Bei den gesamten Versuchen wurde auf eine Zellzahl von 7×10^6 Zellen/ml entsprechend $0,7 \times 10^6$ Zellen/100 μ l eingestellt. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich der Proben ohne Korrektur bezüglich der Zellzahl. Das Einstellen der Zellzahl erfolgte durch Zugabe von PbS-Puffer (mit Ca^{2+} , Mg^{2+} und 0,1 % Glc.) die wie folgt errechnet wurde.

Beispiel: Bei 500 μ l Zellsuspension wurde eine Zellzahl von 14×10^6 /ml errechnet. Dies bedeutet, in 1 ml waren $y = 14 \times 10^3 \times \dots \mu$ l Ausgangssuspension enthalten. Sollte die Zellzahl nun 7×10^6 /ml betragen, entspräche dies 7×10^3 Zellen/ μ l. Um dies zu erreichen wurde das Endvolumen durch folgende Formel errechnet:

$y : (7 \times 10^3) = 14 \times 10^3 \times \dots \text{Ausgangssuspension} : (7 \times 10^3)$
In obigem Beispiel also $2 \times 500 \mu\text{l} = 1000 \mu\text{l}$. Zieht man vom Endvolumen das Ausgangsvolumen ab, erhält man die Menge an Puffer, die notwendig ist, um die gewünschte Zellkonzentration zu erreichen. In diesem Fall also 500 μ l.

Da sich an den Gefäßwänden Reste der Flüssigkeit befanden, war es bei Verdünnungen notwendig eine genaue Menge der Ausgangslösung in ein anderes Gefäß zu pipettieren, um eine genaue Verdünnung zu erreichen. Jeweils vor dem Pipettieren war ein gründliches Mischen der Lösung unerlässlich, da die Zellen sich sehr rasch absetzten.

3.1.3.2. Granulozytenisolierung

Die Isolierung erfolgte nach dem Verfahren von Boyum (1968), welches ermöglicht Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation zu gewinnen. Es wurden dazu Lösungen unterschiedlicher Dichte benötigt, Histopaque^R-1077 und Histopaque^R-1119. Durch Vorlage von 3 ml Histopaque^R-1119, die mit 3 ml Histopaque^R-1077 überschichtet wurden, entstand ein diskontinuierlicher Gradient. 4 ml EDTA-Blut wurden mit 2 ml PbS-Lösung verdünnt. 6 ml des verdünnten EDTA-Blutes wurden nun vorsichtig mittels Pasteurpipette auf den fertigen Gradienten aufgeschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 20°C und 400 x g. Die Zentrifuge mußte ungebremst auslaufen, damit die Zellen verschiedener Dichte in scharfen Banden erhalten blieben. An der Grenzschicht der Isolationsmedien befanden sich die Granulozyten, die Erythrozyten befanden sich am Boden der Röhrchen. Lympho-, Mono-, und Thrombozyten befanden sich an der Plasma-Histopaque^R-1077 Grenzschicht.

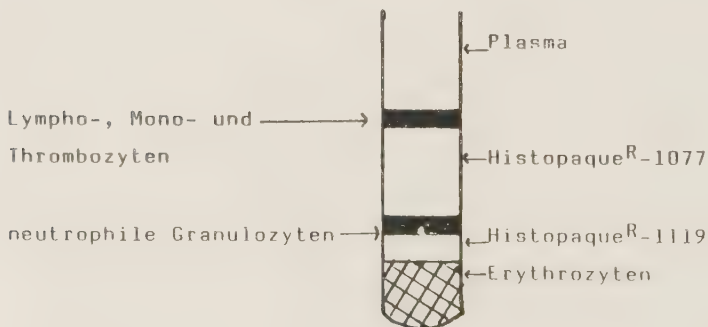


Abb: 1 Blutzelltrennung durch Dichtegradienten.

Nachfolgende Schritte werden im Flußdiagramm veranschaulicht:

- Plasma und bis zur Hälfte der Histopaque^R-1077-Schicht mit der Wasserstrahlpumpe absaugen

- Granulozyten vorsichtig mittels Pasteurpipette von der Grenzschicht absaugen und in ein Reagenzglas geben



- Auffüllen des Reagenzglases mit 0,9 %iger NaCl-Lösung, den Inhalt durch mehrmaliges Hin- und Herschwenken mischen. Zentrifugation bei 20°C und 300 x g für 5 min.

Überstand vorsichtig abkippen

Sediment in 5 ml 4°C kaltem Lysemedium resuspendieren.



Nach 5 min. Auffüllen der Reagenzröhrchen mit 0,9 % NaCl-Lösung



Zentrifugation bei 20°C und 300 x g für 5 min.

Überstand verwerfen.

Sediment in 0,9 % NaCl-Lösung resuspendieren

Zentrifugation bei 20°C und 300 x g für 5 min.

Überstand vollständig entfernen

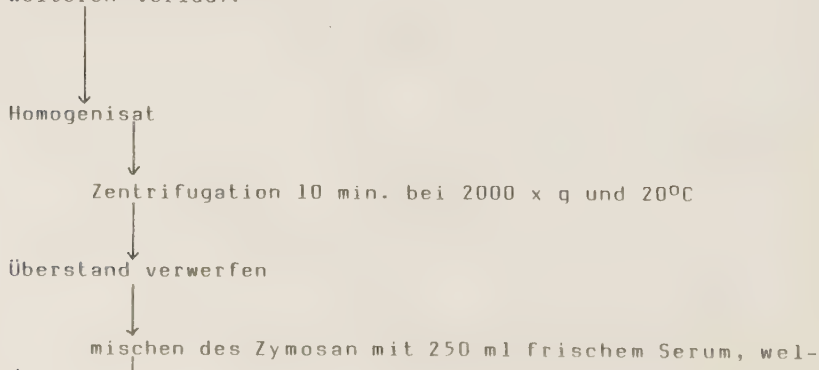


Zellpellet in 0,5 ml PbS-Lösung resuspendieren und anschließend die Zellzahl bestimmen.

Mittels Sysmex Mikrocellcounter CC-110 wurde die gesamte Granulozytenzahl bestimmt. Die Zählung erfolgte auf elektronischem Wege. Der Ansatz für die Zählung sah wie folgt aus: 20 μ l Zellsuspension (wichtig: gut gemischt), 10 ml Isotonlösung und 3 Tropfen Lysemedium wurden in einer Küvette gemischt und an der Elektrode gemessen. Die Zellzahl wurde in Mio./ml angegeben. Um eventuelle Zellschädigungen zu erkennen war eine Lebend-Tod-Färbung unerlässlich, wenngleich in fast allen Fällen die Zahl der toten Zellen kleiner als 1 % war.

3.1.3.3. Präparation von opsonisiertem Zymosan

1000 mg Zymosan A wurden in 100 ml 0,9 % NaCl suspendiert und über Nacht gerührt, da sich Zymosan schlecht in NaCl löst. Danach erfolgte die Homogenisierung mittels Potter-Elvehjem-Apparat. Ein Flußdiagramm veranschaulicht den weiteren Verlauf.



ches aus 500 ml spontan geronnenem Vollblut bei 1000 x g für 10 min. zentrifugiert wird.

30 min. Inkubieren bei 37°C

Auffüllen von 5 Greiner kobaltisierten 50 ml Reagenzgefäßen

Zentrifugation 10 min. bei 600 x g und 20°C.

↓
Überstand verwerfen

↓
In jedem Gefäß Zymosan in 40 ml 0,9 % NaCl-Lösung resuspendieren.

Zentrifugation 10 min. bei 600 x g und 20°C

↓
Überstand verwerfen

↓
Vereinigung der Pellets in einem Greiner Reagenzglas
Zugabe von 40 ml 0,9 % NaCl-Lösung.

Zentrifugation 10 min. bei 600 x g und 20°C

↓
Überstand verwerfen

↓
Resuspension des Zymosans in 20 ml 0,9 % NaCl

Das opsonisierte Zymosan A wurde so in Eppendorf-Hütchen verpackt, daß für eine Ansatzreihe ausreichend Material enthalten war. Um das Zymosan haltbar zu machen mußte es bei -195°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Wichtig war es, während der gesamten Herstellung jeweils nach der Zentrifugation kräftig zu vortexen, um eine vollständige Durchmischung der Suspension zu erhalten.

3.1.3.4. Herstellung von Lysemedium

8,3 g NH_4Cl , 0,037 g EDTA und 1 g KHCO_3 wurden auf einer Analysenwaage abgewogen und in 1000 ml Ampuva gelöst. Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

3.1.3.5. Liposomenpräparation und Charakterisierung

Für die Versuche wurden eine Vielzahl verschiedener Liposomen benötigt. Zum einen war es wichtig, unilamellare Liposomen mit nur einer Lipidschicht herzustellen, zum anderen wurden multilamellare Liposomen mit einer bis mehreren Schichten benötigt. Größe und Zusammensetzung der Liposomen mußten ebenfalls variiert werden. Nachfolgend werden die verschiedenen Herstellungsmethoden beschrieben. Die genaue Zusammensetzung und Größe der Liposomen wurde bei den jeweiligen Ergebnissen angegeben.

Grundlage für die Liposomenpräparation war die Herstellung einer 10 mM Lipidlösung. Diese wurde je nach Versuch aus verschiedenen Anteilen einer Phosphatidylcholin-Stammlösung 100 mg/ml und Cardiolipin-Stammlösung 4,9 mg/ml zusammengestellt. Die Lipide wurden mittels Präzisionsglaspipetten in mit Chloroform/Methanol (2:1) entfettete Glasröhrchen pipettiert. Je nach Versuch wurden Cholesterin oder Detergenzien (C_{12}E_4 , OG oder Na-Cholat) hinzugegeben. Die Glasröhrchen mit der so hergestellten Lösung wurden an einen Rotationsverdampfer mit Wasserbad (30°C) angeschlossen. Das Vakuum wurde nach und nach bis auf einen Wert von 100 mm Hg gesenkt. Hierbei kam es zum Verdampfen der Lösungsmittel. Nach Bildung eines Lipidniederschlages, etwa nach 20 min., je nach Zusammensetzung und Menge, erfolgte die vollständi-

ge Lösungsmittel-Abtrennung durch vierstündige Gefrier-trocknung im Lyophilisator. Der Lipidniederschlag wurde in der entsprechenden Menge Phosphatpuffer aufgenommen. Durch mehrminütiges Vortexen kam es zur Bildung gemischter Micellen. Um aus der Micellen-Lösung Liposomen herzustellen wurden, zwei verschiedene Methoden angewandt.

Zur Herstellung unilamellarer Liposomen sind Lipidgemische mit Detergenzien nötig. Je nach Art des verwendeten Detergens entstehen unterschiedlich große unilamellare Liposomen. 1 - 2 ml der Micellenlösung mit Detergens wurde hierzu in die Dialysekammer eines Liposomenpräparators pipetiert. Die Dialysekammer ist wie folgt aufgebaut:

Eine einseitig offene Kunststoffkammer wird mittels einer Polycarbonatmembran definierter Porengröße verschlossen, zum Beschicken der Kammer dienen 2 Öffnungen, welche mit Kunststoffstiften verschlossen werden können. Diese Kammer rotiert als einzelne beim Mini-Lipoprep, oder 5 Kammern parallel beim Lipoprep GD₁ in 10 mM P-Puffer. Die Dialysedauer betrug 12 Stunden. Die Liposomen bildeten sich indem Detergens gegen Phosphatpuffer abdialysiert wird. Durch Entzug des Emulgators bildeten sich unilamellare Liposomen, was anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen bewiesen werden konnte.

Zur Herstellung multilamellarer Liposomen aus Lipidlösungen ohne Detergensanteil war die geeignetste Methode die Extrusion durch Membranen definierter Porengröße. Hierbei wurde die Lipidlösung in die Kammer des Extrudors pipetiert. Nach Schließen der Kammer wurde der Druck mittels Stickstoffgas so lange erhöht, bis ein langsamer Fluß der Lösung durch die Membran erreicht wurde. Dieser Vorgang mußte mehrmals wiederholt werden um die Homogenität der Liposomen zu erhöhen. Die Liposomengröße wurde dadurch ver-

kleinert, daß Membranen von immer kleiner werdendem Porendurchmesser verwendet wurden. Die hergestellten Liposomen wurden in Eppendorf-Hütchen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Da die Liposomen nur max. 5 - 7 Tage stabil waren, mußten wiederholt Liposomen hergestellt werden, was zu einer großen Zahl verschieden großer Liposomen führte.

Größenbestimmung der Liposomen über Laserautokorrelationsspektrometrie:

Mit Hilfe des Nanosizers konnte die Liposomengröße direkt bestimmt werden. Das Gerät mißt mittels Laserautokorrelationsspektrometrie die Größe von in Suspension befindlichen Partikeln in einem Größenbereich von 40 - 3000 nm. Grundprinzipien des Gerätes sind die Autokorrelation von gestreutem Laser-Licht und die Brown'sche Molekularbewegung. Vom Suspensionsmedium mußten Brechungsindex, Viskosität und Temperatur bekannt sein. Gemessen werden periodische Schwankungen der Lichtstreuung, welche für jede zu messende Größe konstant sind. Die Frequenz der Brown'schen Molekularbewegung ist umgekehrt proportional dem Partikeldurchmesser, welcher aus der Stokes-Einstein-Beziehung berechnet werden kann.

Nach 10 minütigem Warmlaufen des Gerätes wurden 10 - 20 µl der Liposomenlösung mit 500 µl P-Puffer in die Messröhrchen pipettiert und vermischt. Nach Einstellen der Temperatur wurde die Probe ins Gerät gestellt. Aus jeweils 3 vergleichbaren Werten wurde ein Mittelwert bestimmt. Die Angabe erfolgte in nm/Streuungsindex.

3.1.3.6. Herstellung carboxyfluoreszinhaltiger Liposomen

Reinigung von Carboxyfluoreszin: Für die Herstellung CF-haltiger Liposomen mußte CF gereinigt werden (Ralston et al 1981). Es wurden 5 l eines 50 mM $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ -Puffer hergestellt (19,8 g/5l). In 30 ml Puffer wurden 4 g CF suspendiert und mit 25 % NH_3 auf pH 7,9 eingestellt und gelöst. Verunreinigungen wurden säulenchromatographisch abgetrennt. Sephadex LH 20-Gel wurde mit dem hergestellten $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ -Puffer equilibriert und dann die CF-Lösung aufgetragen. Verunreinigungen, die hydrophiler als CF waren, kamen in der ersten Fraktion. Hydrophobe Verunreinigungen hingegen sammelten sich im oberen Teil der Säule an. Den Beginn der zweiten Fraktion mit dem gereinigten CF konnte man mit der Fluoreszenzprobe erkennen. Danach wurde das gereinigte CF am Lyophilisator getrocknet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und nochmals getrocknet. Die Reinheit wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

Liposomenpräparation (Weinstein et al 1977): Um CF in Liposomen einschließen zu können, wurden 10 ml einer 30 mM-Lösung von gereinigtem CF hergestellt. Das CF wurde mit P-Puffer der Osmolarität 260 mOsm (3,5 g NaCl + 0,89 g $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 0,95 ml 1 normale HCl auf 500 ml H_2O) versetzt und mit 10 M NaOH auf pH 7,35 eingestellt. Dabei geht das CF in Lösung, die Farbe schlägt von gelb auf dunkelrot um und die Lösung wird klar. Danach wurde das CF zum vorbereiteten und getrockneten Lipid gegeben. Es wurde so lange gemischt, bis der Lipidfilm vollständig aufgelöst war. Das CF-Lipidgemisch wurde dann, wie oben beschrieben, extrudiert. 2 ml der entstandenen multilamellaren Liposomen wurden säulenchromatographisch vom übrigen CF getrennt. Beim Beschicken der Säule war es wichtig den Puffer bis auf Hö-

he des Säulenmaterials abzusenken, die Liposomen gleichmäßig aufzutragen und auf Höhe des Säulenmaterials einsinken zu lassen. Danach wurde mit Puffer überschichtet und die Säule gestartet. Die Flußgeschwindigkeit wurde mittels Pumpe eingestellt. Die Liposomen kamen als erste hellgelbe Fraktion nach ca. 15 min. Ihr folgte eine orangefarbene CF-Fraktion die in den Übergangsbereichen fluoreszierte (Verdünnungseffekt). Die Liposomen wurden bei 15°C aufbewahrt. Fluoreszierende Liposomenlösungen waren defekt und somit nicht mehr zu verwenden. Die Liposomen zeigten nur eine Haltbarkeit von 2 - 4 Tagen.

3.1.3.7. Chemilumineszenzmessung

Die Lichtverstärkung der phagozytierenden oder stimulierten Zellen wurde durch Luminol erreicht, welches seine Photonen bei einem Maximum von 420 nm aussendet. Ohne Verstärkersubstanz sind die Signale zu gering. Das Optimum der Empfindlichkeit des Photomultipliers ist so angelegt, daß die relativ enge Wellenlängenverteilung der Verstärkersubstanzen in diesen Bereich zu liegen kommen. Die Intensität der Chemilumineszenz wird gemessen, indem die ausgesendeten Photonen in einer linear fokussierten Photovervielfacherröhre gezählt werden. Die elektrischen Impulse werden als cpm (Impulse/min.) registriert. Die Aufzeichnung erfolgte mit dem Apple^R Anwenderprogramm.

Versuchsablauf: In den speziellen Kunststoffküvetten (Berthold, Wildbad) wurden jeweils Probenansätze mit einem Gesamtvolumen von 670 µl eingesetzt. Es liefen ein Nullwert (ohne zu phagozytierende Partikel, um das Hintergrundrau-

schen von dem eigentlichen Phagozytosevorgang abziehen zu können) sowie eine Kontrollmessung mit opsonisiertem Zymosan (die nötig war um verschiedene Messungen vergleichen zu können) parallel.

Ansätze:

100 μ l Zellsuspension (7×10^6) Zellen/ml + 500 μ l PbS-Puffer mit Calcium, Magnesium und 0,1 % Glc. + 50 μ l Luminol^R 10^{-4} M

Nach dem Einpipettieren der Substanzen wurden die Küvetten vorsichtig gemischt. Die Küvetten wurden nun in die 37°C warme Messkammern des Biolumat^R LB9505 eingesetzt und das Gerät gestartet. Nach einer Vorinkubation von 10 min. erfolgte die Zugabe der Phagozytosepartikel. Danach wurde nochmals gemischt, die Küvette rasch zurück in die Kammer gebracht und diese geschlossen. Die Messwerte wurden über eine Zeit von 40 min. mittels Computer registriert. Bei Veränderungen des Einsatzes an Zellsuspension oder Partikeln wurde entsprechend mit PbS-Puffer ausgeglichen, um das Volumen konstant zu halten.

Auswertung:

Bei der Auswertung der Chemilumineszenzkurven wurden die Integralwerte (Fläche der Kurve) vorrangig behandelt, da sie einen geringeren statistischen Fehler beinhalten als Einzelmesswerte, wie z.B. das Kurvenmaximum. Eine Korrektur der vorliegenden Chemilumineszenzwerte bezüglich der Zellzahl wurde durch Konstanthalten der Zellzahl beim Ansatz überflüssig. Um die Werte verschiedener Messungen vergleichen zu können, mußte jeweils der Nullwert subtrahiert werden. Die so entstandenen Werte wurden durch Multiplikation mit einem Faktor korrigiert. Bei der Errechnung des Faktors diente Zymosan als Kontrollsubstanz.

Ein Problem bei der Verwendung des Biolumat-6-Kanal Gerätes stellten die 6 getrennt messenden Photomultiplier dar, die von der Firma optimal ausgesucht waren, um im gleichen Wellenbereich ihr Optimum zu haben. Dennoch mußte in kürzeren Zeitabständen die sich ändernde Empfindlichkeit der Photomultiplierkathoden durch Korrekturfaktoren korrigiert werden. Das Abgleichen der 6 Kanäle mittels Lichtquellen definierter Wellenlängenbereiche war unzureichend. Es wurde wie von der Firma Berthold beschrieben vorgegangen. Sie empfiehlt als Probesubstanz einen Ansatz zu verwenden, der dem der Versuchsreihe entspricht. Am wichtigsten war dabei die Verstärkersubstanz Luminol^R, deren Wellenbereich bei 420 nm liegt. Um die Kanäle gegeneinander abgleichen zu können, wurde die Probe in allen 6 Kanälen mehrmals parallel gemessen. Da die Kurven jedoch nicht über längere Zeit ein gleichbleibendes Plateau hatten, wurde auch dieser Ausgleich ungenau. Nach mehreren Versuchen ergab sich, daß bei Verwendung von nicht opsonisiertem Zymosan im Überschuß (50 µl auf $0,4 \times 10^5$ Zellen) eine Kurve mit lange gleichbleibendem Plateau entsteht. Diese ermöglichte es 4 - 5 Parallelwerte aller Kanäle zu messen und über deren Mittelwerte die Ausgleichsfaktoren zu errechnen. Wiederholte Kontrollmessungen zeigten ein optimales Übereinstimmen der Kanäle.

3.1.3.8. Fluoreszenzmikroskopie

Parallel zu einem Ansatz im Biolumaten wurden die Liposomen in einem Ansatz mit doppelter Menge, ebenfalls bei 37°C, mit Makrophagen inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zeit erfolgte die Hemmung der Zellaktivität mittels 3,7 %

Formalin. Anschließend wurden die Zellen bei 120 x g über 10 min. abzentrifugiert, zweimal mit PbS-Puffer gewaschen und jeweils wieder abzentrifugiert. Die so von freien Liposomen gereinigten Alveolarmakrophagen wurden 1 : 2 mit PbS-Puffer verdünnt und über eine Cytozentrifuge auf entfettete Objektträger zentrifugiert. Die so hergestellten Präparate wurden bei 400-facher Vergrößerung unter dem Zeiss-Standard Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Anregungswellenlänge von 450 nm - 490 nm war für CF ideal, die Wellenlänge des Emissionslichts betrug 520 nm. Ein für das Gesamtpräparat relevanter Ausschnitt wurde mittels Olympus UN2 Kamera photographiert.

3.1.3.9. In vivo Stimulation der Phagozytoseaktivität

Als Paramunität wird nach Mayr der Zustand eines schnell entstehenden, unterschiedlich lang anhaltenden, nichterreger- und nichtantigenspezifischen, erhöhten Schutzes eines Individuums gegenüber einer Mehrzahl ganz unterschiedlicher Infektionen und Antigene bezeichnet. Der Zustand der Paramunität ist ein sehr variables Schutzsystem, bei dem je nach Art der Stimulierung z.B. die Phagozytose, die SCMC (spontane zellvermittelte Cytotoxizität) die humoralen Mechanismen, die Makrophagentätigkeit, die T- und B-Zellstimulierung oder die Interferonproduktion dominieren.

Der Einfluß auf die Phagozytoseaktivität von Ratten-Alveolarmakrophagen wurde untersucht, indem die Tiere mit verschiedenen Inducern behandelt wurden. Als Inducer standen zur Verfügung:

Viraler Paramunitätsinducer: PIND-avi aus attenuierten Avipoxvirus gallinae-Stamm HP-1.

Ein Inducer aus E.coli 08 Lysat, der mit und ohne Lysozym-zusatz verwendet wurde. Beide wurden vom Institut für medizinische Mikrobiologie Infektions- und Seuchenmedizin der tierärztlichen Fakultät der Universität München zur Verfügung gestellt. Als pflanzliches Präparat zur Steigerung der unspezifischen Abwehr diente Echinacin^R (0,1 g/2 ml). Die Ratten (400 - 500 g KG) wurden 24 Stunden vor Gewinnung der Alveolarmakrophagen behandelt. Hierzu wurde der Inhalt einer Originalpackung PIND-avi mit 4 ml NaCl aufgelöst. Das E.coli-Lysat mußte 1 : 10 vorverdünnt werden. Diese beiden Stoffe wurden jeweils subcutan im Bereich der rippengeschützten Brustwand injiziert. Die Echinacininjektion erfolgte streng intramuskulär. Als Plazebo diente 0,5 ml phys. NaCl die gleichfalls subcutan injiziert wurde.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Vorversuche

Die Verwendung von calcium- und magnesiumfreiem Medium (Pavillard 1973) machte es erst möglich eine brauchbare Zahl von Alveolarmakrophagen (AM) aus den Lungen der Ratten zu isolieren. Eine weitere Steigerung der Zellausbeute um 20 % konnte unter Verwendung von zusätzlich 1 mM EDTA in der Spüllösung (Brain und Frank 1973) erzielt werden. Weiter war bemerkenswert, daß eine Spülung direkt nach dem Ausbluten der Tiere bis zu 10 % weniger Zellen erbrachte, als wenn zwischen Ausbluten und Spülung eine Zeitdifferenz von bis zu 10 min. lag. Nach dieser Zeit schienen sich die Zellen besser aus dem Zellverband zu lösen. Dementsprechend wurde die Spülung jeweils genau 10 min. nach dem Ausbluten

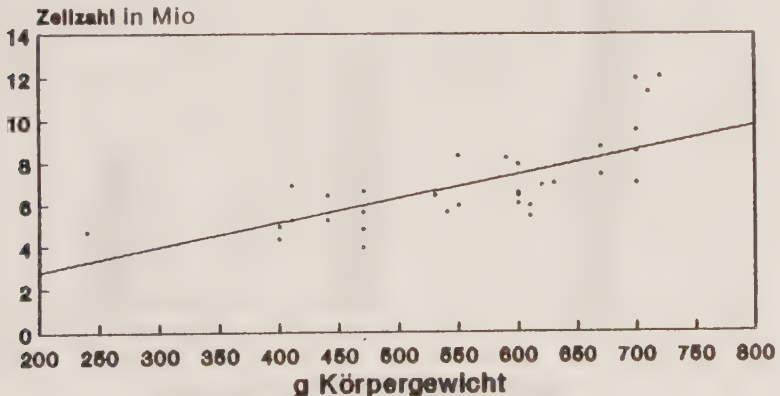


Abb. 2: Gewonnene Gesamtalveolarmakrophagenzahl in Abhängigkeit vom Körpergewicht der Tiere durchgeführt.

der Tiere durchgeführt. Die so gewonnenen Spülungen wurden von jedem Tier, unter Berücksichtigung des Körpergewichts, auf den Gesamtgehalt von Zellen hin untersucht. Für die Versuche war nur die Zahl der lebenden Zellen von Interesse, hier wurde jedoch die Gesamtzellzahl (lebende und tote) berücksichtigt. Eine direkte Beziehung zwischen dem Körpergewicht und der gewonnenen Gesamtzellzahl gibt Abb. 2 wieder.

Bei der Chemilumineszenzmessung von Zellen, war dem Zeitabstand zwischen Gewinnung und Einsatz im Biolumaten eine besondere Bedeutung zuzumessen. Obwohl alle Schritte der Gewinnung, wie Zahl der Spülungen und Zentrifugationszeiten übereinstimmten, war die Gefahr von zeitlichen Verschie-

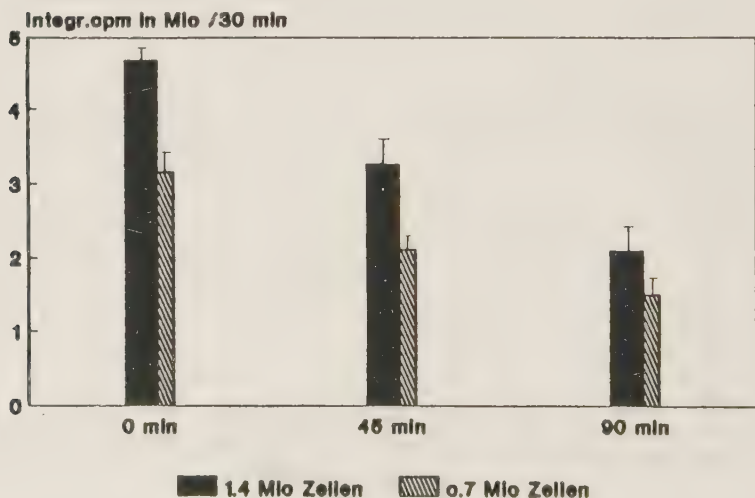


Abb. 3: Zeitabhängige Minderung der Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen

bungen infolge der Trennung der Arbeitsräume für Spülung und Chemilumineszenzmessung sehr groß. Wie hoch der Einfluß der Zeitspanne zwischen Gewinnung der Zellen und Einsatz im Test auf die Chemilumineszenz, sprich Phagozytoseaktivität der Zellen ist, zeigt Abb. 3. Hierzu wurden Alveolarmakrophagen einer Ratte zum Zeitpunkt 0 min., 45 min., und 90 min. nach der Isolierung zur Chemilumineszenz eingesetzt. Parallel dazu wurde eine Messung mit doppelter Zellmenge durchgeführt. Als Phagozytosepartikel dienten 20 µl einer 10 mM Liposomenlösung PC : CL (Phosphatidylcholin : Cardiolipin) 60 : 40. Die Liposomen mit einer Größe von 410/3 nm waren multilamellar. Abb. 3 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Paralleluntersuchungen.



Abb. 4: Vergleich im Verlauf der Chemilumineszenz von Granulozyten und Alveolarmakrophagen

Abb. 4 zeigt den gleichartigen Kurvenverlauf bei der Chemilumineszenz von Alveolarmakrophagen und Granulozyten. Es wurden im Ansatz jeweils 0,7 Mio. Zellen eingesetzt. Nach 10 min. Vorinkubation wurden 20 μ l obsonisierten Zymosans zugegeben.

Die Chemilumineszenz von Granulozyten ist schon sehr genau untersucht. Bekannt ist, daß die Chemilumineszenzantwort von neutrophilen Granulozyten um ein vielfaches höher ist als die von mononukleären Zellen. Eine direkte Gegenüberstellung erfolgt in Abb. 5. Abb. 5 demonstriert die dominierende Rolle der granulozytären Chemilumineszenz gegenüber der von Alveolarmakrophagen. Es wurden die Spontanwerte und die Werte nach Inkubation mit 20 μ l opsonisiertem Zymosan von 4 Messungen gegenübergestellt.

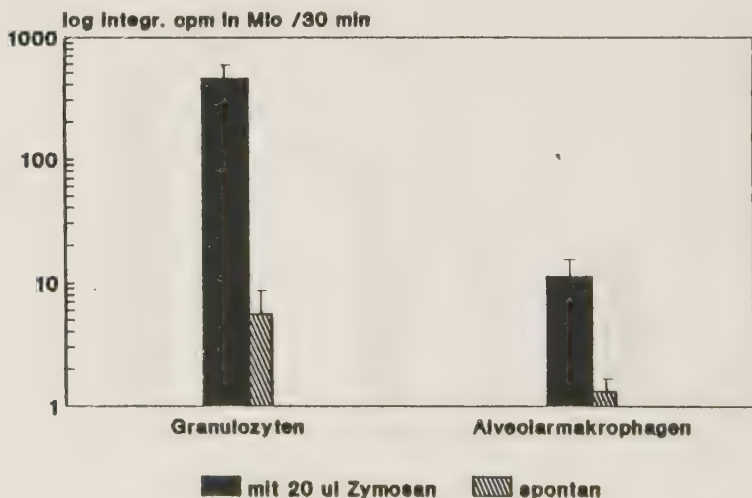


Abb. 5: Chemilumineszenz isolierter Granulozyten und Alveolarmakrophagen

3.2.2. Einfluß der Makrophagenzahl auf die Chemilumineszenz

Abb. 6 demonstriert den Einfluß der Alveolarmakrophagenzahl auf die Chemilumineszenz. Bei gleichbleibend 20 µl einer Liposomensuspension PC : CL, 60 : 40 und 50 % Cholesterin mit einer Größe von 630/3 nm, wurde die Zellzahl konstant erhöht. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 Vergleichsmessungen verwendet.

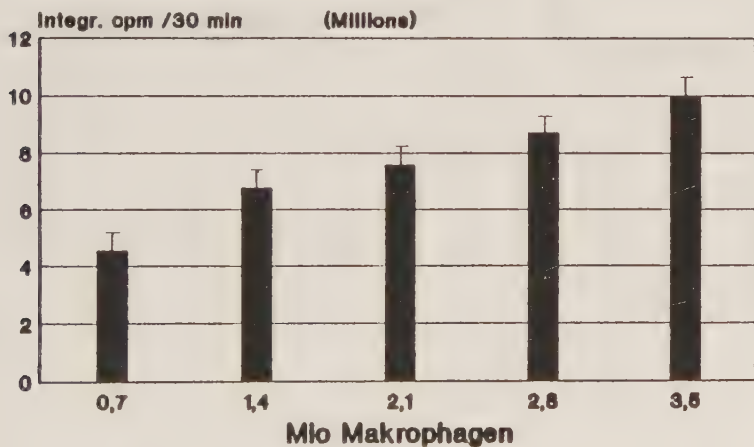
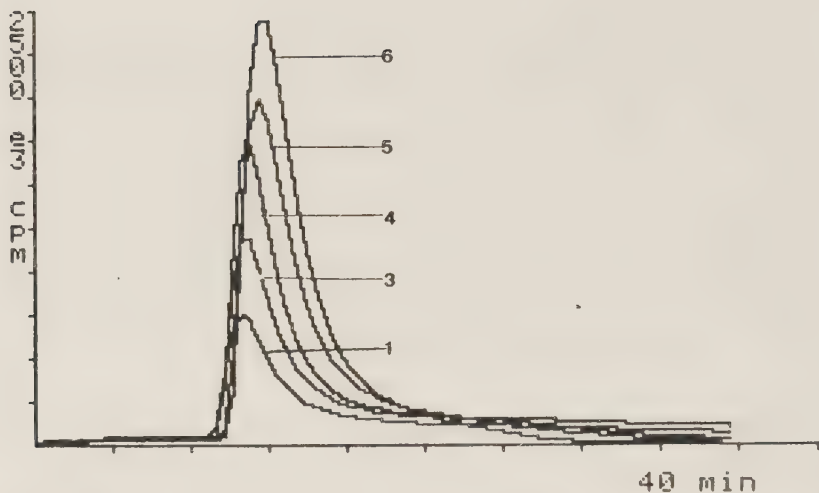


Abb. 6: Chemilumineszenz bei unterschiedlicher Alveolarmakrophagenzahl



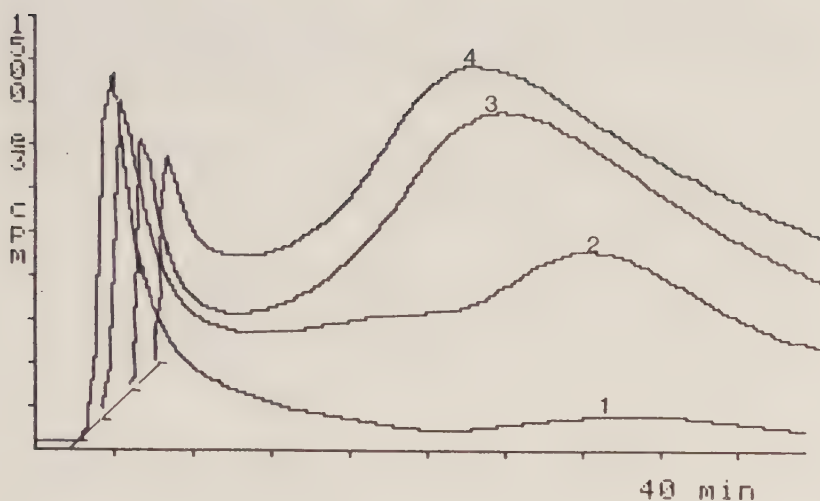
CHANNEL	INT. (CPM)	PEAK (CPM)	T. HALF MAX. (RISE)	T. MAX	COMMENT TO CHANNEL
1	5229	761	9.3	10.6	0.7 Mio Zellen
2	1	2	<	0	
3	7468	1188	9.7	10.6	1.4 Mio Zellen
4	8281	1718	9.7	11.1	2.1 Mio Zellen
5	9570	1994	10.2	11.5	2.8 Mio Zellen
6	10771	2440	10.6	11.5	3.5 Mio Zellen

INTEGRATIONTIME FROM 0 TO 40 MIN
ALL CPM-VALUES X1000

Abb. 7: Verlauf der Chemilumineszenzkurve bei unterschiedlicher Zellzahl

3.2.3. Chemilumineszenzkurvenverlauf bei steigender Liposomenmenge

Den typischen Kurvenverlauf bei gleichbleibender Zellzahl, 0,7 Mio., und steigender Liposomenmenge wird in Abb. 8 dargestellt. In vier Parallelversuchen konnten jeweils vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Im Ansatz wurden multilamellare PC : CL, 60 : 40 Liposomen mit einer Größe von 800/3 nm verwendet.



1. 20µl Liposomensuspension 3. 40µl Liposomensuspension
2. 30µl Liposomensuspension 4. 50µl Liposomensuspension

Abb. 8: Verlauf der Chemilumineszenz bei unterschiedlicher Liposomenmenge

3.2.4. Einfluß des Cardiolipingehalts auf die Chemilumineszenz

Für die nachfolgenden Messungen wurden Liposomen mit steigendem Cardiolipingehalt, beginnend mit reinen PC- (Phosphatidylcholin) Liposomen, bis hin zu reinen CL- (Cardiolipin) Liposomen hergestellt. Mittels entfetterter Hamiltonspritzen wurden die Lipidstammlösungen für die Liposomenpräparation nach folgendem Schema pipettiert.

Tab. 1: Pipettierschema zur Herstellung von jeweils 1 ml einer 10 mmol Lipidlösung mit steigendem CL-Gehalt

Lipidverhältnis	PC-Stammlösung/ml		CL-Stammlösung/ml	
	mg	ml	mg	ml
PC 100 %	7,80	0,078		
PC : CL 90 : 10	7,02	0,070	1,575	0,320
PC : CL 80 : 20	6,24	0,062	3,150	0,643
PC : CL 60 : 40	4,68	0,047	6,300	1,286
CL 100 %			15,750	3,214

Nach Trocknung der Lipidgemische und Aufnahme in Puffer wurden die Liposomen durch eine Polycarbonatmembran von 600 nm Porenweite extrudiert. Danach erfolgte die Größenbestimmung im Nanosizer. Tab.2 gibt die Größe und Polydispersität der Liposomen wieder. Die Angaben der Polydispersität erfolgte von 0-9, wobei die Bereiche 0-3 als "gut" und 9 als "schlecht" zu bezeichnen sind. Die Messdauer im Nanosizer betrug jeweils 1 min.

Tab. 2: Liposomengröße und Polydispersität von Liposomen mit steigendem CL-Gehalt

Lipidverhältnis	Polydispersität	Größe in nm
PC 100 %	3/4/4	670/680/680
PC : CL 90 : 10	3/3/3	650/650/640
PC : CL 80 : 20	2/3/3	600/600/600
PC : CL 60 : 40	3/3/3	613/620/613
CL 100 %	2/3/3	620/610/620

Nach Korrektur der Werte, Abzug des O-Wertes und Korrektur auf einen gemeinsamen Zymosanwert, um die Werte verschiedener Messungen vergleichen zu können, ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tab. 3: Ergebnisse der Chemilumineszenz bei steigendem CL-Gehalt der Liposomen

Chemilumineszenzwerte als Integr. cpm x 1000			
Lipidverhältnis	Meßwert	O-Wert	korrigierter Wert
PC 100 %	1880	873	1027
	1838	873	984
PC : CL 90 : 10	5409	3021	1910
	6542	3021	2816
PC : CL 80 : 20	4303	873	3498
	3795	873	2980
PC : CL 60 : 40	11715	3021	6955
	10454	3021	5946
CL 100 %	17220	2999	14363
	14277	2999	11390

Reine CL-Liposomen zeigen gegenüber reinen PC-Liposomen 10-12 fache Countzahl. Neben den Integralwerten ist der unterschiedliche Kurvenverlauf je nach CL-Gehalt von Bedeutung. Abb. 9 gibt die Mittelwerte und die Standardabweichungen von zwei Parallelversuchen wieder.

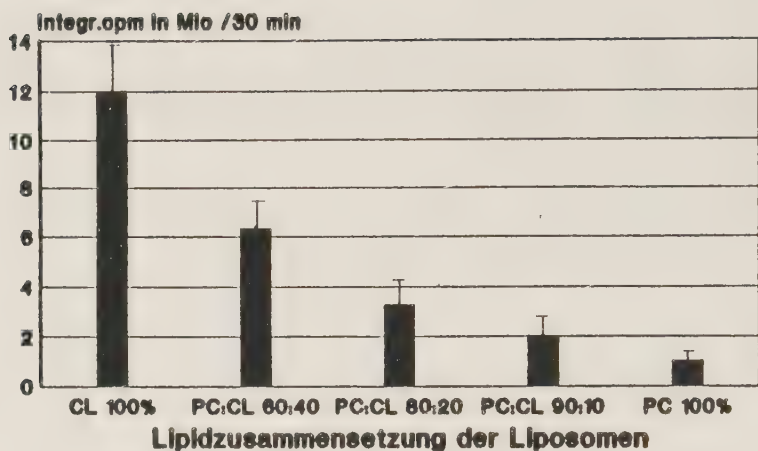


Abb. 9: Chemilumineszenz bei der Phagozytose von Liposomen mit unterschiedlichem CL-Gehalt

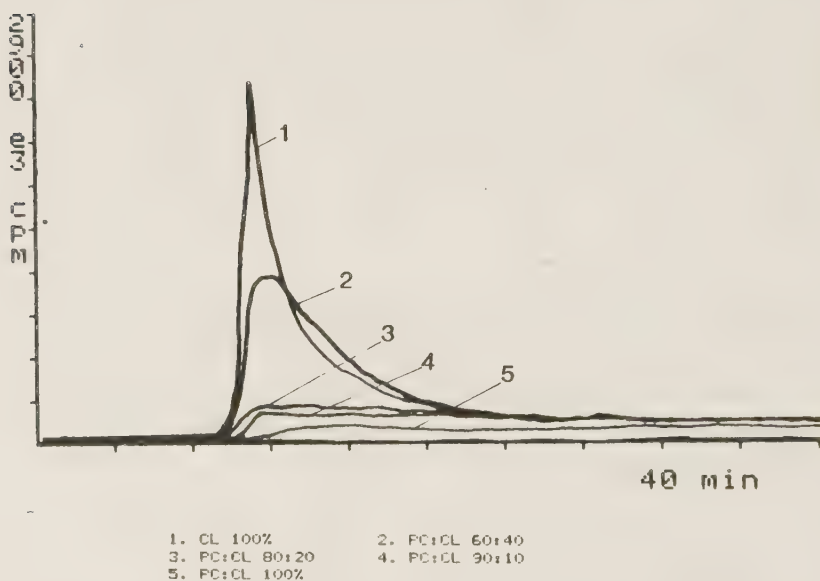
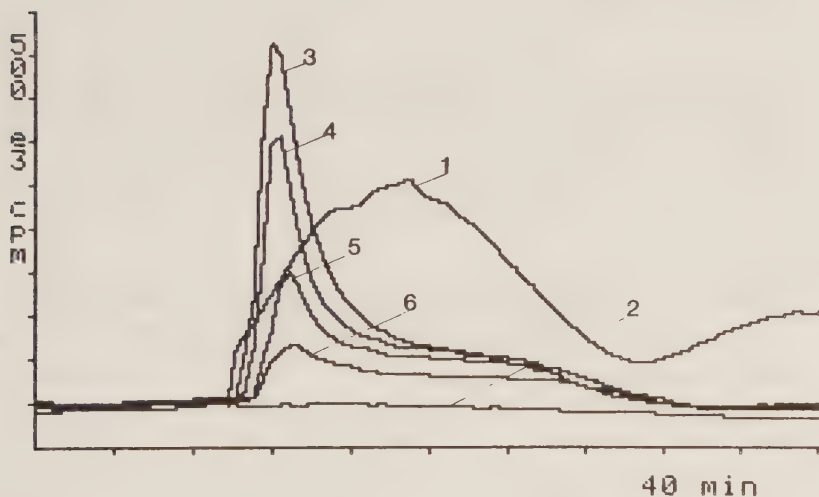


Abb. 10: Verlauf der Chemilumineszenz bei der Phagozytose von Liposomen mit unterschiedlichem CL-Gehalt

3.2.5. Chemilumineszenz in Abhängigkeit vom Cholesterin-Gehalt der Liposomen

Cholesterin leistet einen wesentlichen Beitrag zur Stabilität von Biomembranen. Die Beweglichkeit von Phospholipiden wird durch Cholesterineinlagerung verringert. Damit sinkt die Fluidität der Membran und somit deren Permeabilität. In



CHANNEL	INT. (CPM)	PEAK (CPM)	T. MAX	COMMENT TO CHANNEL
1	6211	306	18.6	kontrolle
2	1779	54	8.8	0-Wert
3	3979	464	12	PC:CL 60:40 +30% CHOL MLV 600/4
4	3603	357	12.4	DITTO 330/4
5	3105	201	12.8	DITTO 240/4
6	2674	119	12.8	DITTO 120/3

INTEGRATIONTIME FROM 0 TO 40 MIN
ALL CPM-VALUES X1000

Abb. 11: Verlauf der Chemielumineszenz bei der Phagozytose von multilamellaren PC : CL, 60 : 40 + 30 % CHOL Liposomen unterschiedlicher Größe

einer PC : CL, 60 :40 Mischung wurde ein Cholesteringehalt von 30 % und 50 % eingesetzt, wobei die Lipidgehalte im gleichen molaren Verhältnis erniedrigt wurden.

Tab. 4: Pipettierschema für die Herstellung von 1 ml einer 10 mmol Lipidsuspension mit einem Cholesteringehalt von 30 % und 50 %

Cholesteringehalt	PC/ml		CL/ml		CHOL/ml
	mg	ml	mg	ml	mg
30 %	3,276	0,033	4,41	0,90	1,31
50 %	2,340	0,023	3,15	0,64	1,93

Nach Extrusion durch Membranen unterschiedlicher Porenweite (800-100 nm) ergaben sich im Nanosizer folgende Größen der multilamellaren Liposomen:

Tab. 5: Größe und Polidispersität der multilamellaren Liposomen

Cholesteringehalt	Polydispersität	Größe in nm
50 %	4/4/4	800/790/810
	3/3/3	650/640/650
	3/2/3	340/350/340
	3/2/3	370/360/370
	3/3/3	240/240/240
	2/1/2	250/240/250
	2/2/2	160/150/160

Fortsetzung Tab. 5:

	1/2/2	128/128/128
30%	4/5/5	700/690/700
	4/4/4	610/600/590
	3/3/3	400/400/410
	3/2/3	325/330/340
	4/3/4	250/240/250
	2/1/2	164/165/168
	2/2/2	120/120/120

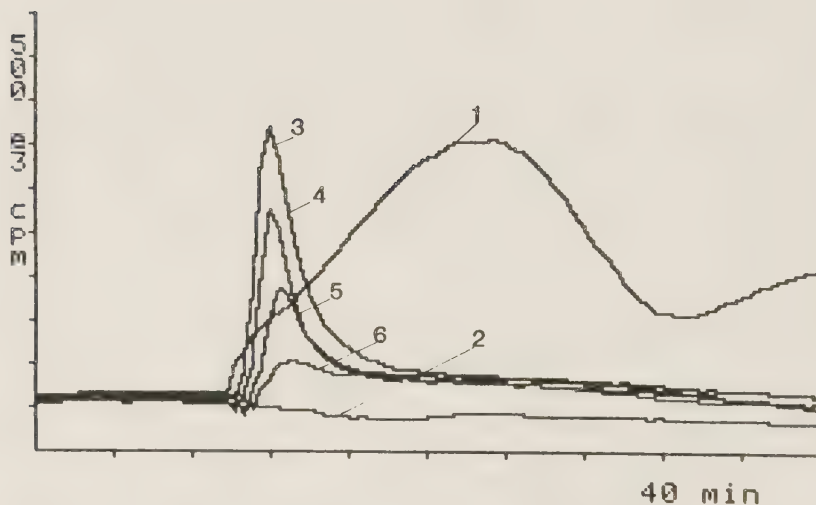
Abb. 11 und 12 zeigen den Verlauf der Chemilumineszenz bei der Phagozytose von Liposomen mit einem Cholesteringehalt von 30- und 50 %. Es wurde jeweils eine Abbildung repräsentativ für 2 Parallelversuche dargestellt.

Tab. 6: Chemilumineszenzwerte von Liposomen mit 30- und 50% CHOL und unterschiedlicher Größe

Chemilumineszenzwerte als Integr. cpm x 1000				
CHOL-Gehalt	Größe	Messwert	0-Wert	korrr. Wert
50 %	800/4	4333	1528	3085
	370/3	4151	1636	2777
	250/3	4025	1784	2465
	166/2	3494	1892	1622
	650/3	3744	1811	2706
	340/3	3147	1811	1883
	240/3	3247	1811	2016
	128/2	2876	1811	1065
30 %	700/5	4639	703	4055
	400/3	3962	849	3206

Fortsetzung Tab. 6:

250/4	3835	877	3047
165/2	2860	1091	1823
600/4	3979	1779	3960
330/3	3604	1779	3285
240/2	3105	1779	2386
120/3	2674	1779	1611



CHANNEL	INT. (CPM)	PEAK (CPM)	T. MAX	COMMENT TO CHANNEL
1	7819	357	23.1	Kontrolle
2	1811	58	5.3	0-Wert
3	3744	372	12	PC:CL 60:40 +50% CHOL MLV 650/3
4	3147	278	12	DITTO 340/3
5	3241	187	12.4	DITTO 240/3
6	2876	104	12.8	DITTO 128/2

INTEGRATIONTIME FROM 0 TO 40 MIN
ALL CPM-VALUES X1000

Abb. 12: Verlauf der Chemilumineszenz bei multilamellaren
PC : CL, 60 : 40 + 50 % CHOL Liposomen unter-
schiedlicher Größe

Eine Gegenüberstellung der Werte zeigt Abb. 13.

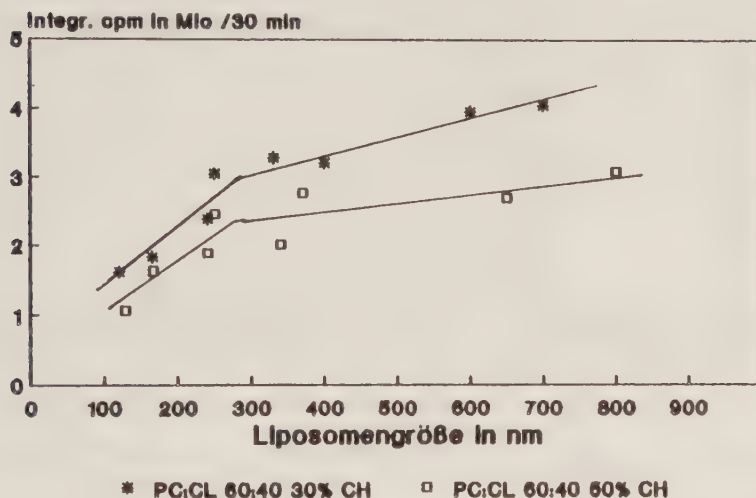
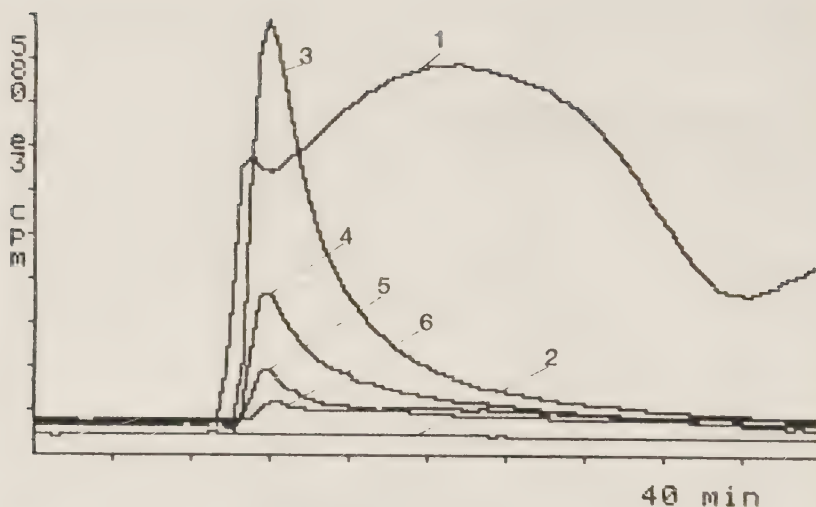


Abb. 13: Chemilumineszenz bei der Phagozytose von PC : CL, 60 : 40 Liposomen unterschiedlicher Größe mit einem CHOL-Gehalt von 30 % und 50 %

3.2.6. Einfluß der Lamellarität auf die Chemilumineszenz

Eine unilamellare Lipiddoppelmembran entspricht der biologischen Membran. Hier wurde der Einfluß der Membranschichtung von Liposomen auf die Chemilumineszenz untersucht. Die Ansätze für die Liposomenpräparation zeigt Tab. 7. Es wurde hierbei ebenfalls ein Lipidverhältnis von PC : CL, 60 : 40 gewählt.



CHANNEL	INT. (CPM)	PEAK (CPM)	T. HALF MAX. (RISE)	T. MAX	COMMENT TO CHANNEL
1	12314	519	10.2	21.3	Kontrolle
2	1100	31	<	8.8	O-Wert
3	4529	576	10.6	12	PC:CL 60:40 LUV 650/4
4	2678	213	10.6	11.5	DITTO 240/4
5	2135	115	10.6	11.5	DITTO 176/4
6	2178	71	<	12	DITTO 147/4

INTEGRATIONTIME FROM 0 TO 40 MIN
ALL CPM-VALUES X1000

Abb. 14: Verlauf der Chemilumineszenz von Alveolarmakrophagen mit unilamellaren Liposomen

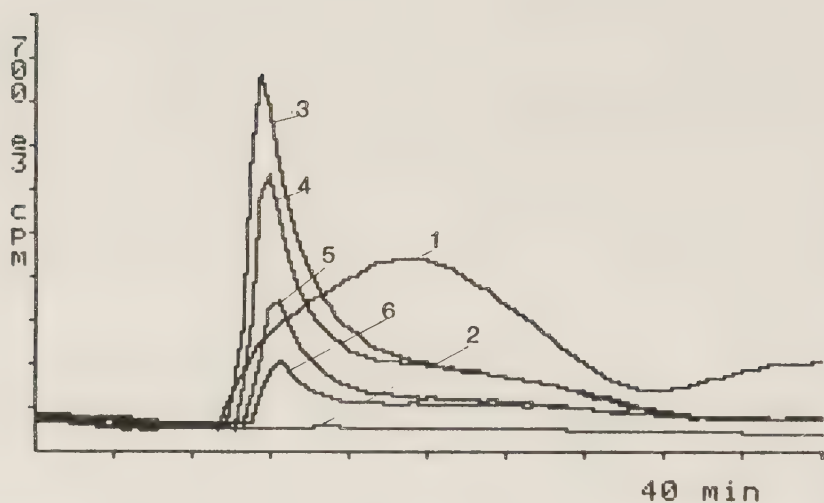
Tab. 7: Pipettierschema für die Herstellung von 1 ml einer 10 mM Lipidlösung für die Präparation von multilamellaren und unilamellaren Liposomen

PC : CL, 60 : 40 Liposomen	PC/ml		CL/ml		Detergenz
	mg	ml	mg	ml	mg
multilamellar	4,68	46,8	6,3	1,286	-
unilamellar	4,68	46,8	6,3	1,286	15

Für die Versuche wurden jeweils 3 ml der Lipidlösung benötigt. Zur Herstellung der unilamellaren Liposomen wurde die Lipidsuspension mit dem Detergenz 12 Stunden dialysiert. Die Präparation der multilamellaren Liposomen erfolgte mit dem Extruder. Unterschiedliche Größen wurden bei uni- und multilamellaren Liposomen durch den Einsatz von Membranen unterschiedlicher Porenweite im Extruder erzielt. Die Charakterisierung der entstandenen Liposomen im Nanosizer zeigt Tab. 8.

Tab. 8 : Größe und Homogenität der multi- und unilamellaren
PC : CL, 60 : 40 Liposomen

PC : CL, 60 : 40 Liposomen	Polydispersität	Größe in nm
multilamellar	4/4/4	560/550/570
	3/4/3	400/390/400
	4/3/4	360/350/360
	4/4/4	250/240/250
	3/4/3	220/210/220
	3/3/3	209/200/220
	3/2/3	156/160/156
	2/2/2	100/ 99/100
unilamellare	4/3/4	640/650/650
	2/1/1	528/528/530
	4/4/4	240/240/240
	2/3/3	220/210/220
	4/4/4	176/176/180
	2/2/2	150/140/160
	2/1/2	147/147/148
	2/2/2	106/106/106



CHANNEL	INT. (CPH)	PEAK (CPH)	T. HALF MAX. (RISE)	T. MAX	COMMENT TO CHANNEL
1	6277	310	10.6	19.1	Kontrolle
2	1522	50	<	0	0-Wert
3	4907	602	10.6	11.5	PC:CL 60:40 MLV 560/4
4	4212	447	11.1	12	DITTO 360/4
5	3075	244	11.1	12.4	DITTO 220/3
6	2754	146	11.1	12.4	DITTO 100/2

INTEGRATIONTIME FROM 0 TO 40 MIN
ALL CPM-VALUES X1000

Abb. 15: Verlauf der Chemilumineszenz von Alveolarmakrophagen mit multilamellaren Liposomen

In Tab. 9 sind die Integralwerte der Chemilumineszenzmessung nach Korrektur der Werte aufgelistet.

Tab. 9: Chemilumineszenz von Alveolarmakrophagen bei der Phagozytose von uni- und multilamellaren Liposomen

Werte als Integr. cpm x 1000/0,7 Mio. Zellen/30 min.

Liposomen	Größe in nm	Messwert	0-Wert	korrr. Wert
multilamellar	560/4	4908	1522	6061

Fortsetzung Tab. 9:

	400/3	7600	3595	4806
	360/4	4213	1522	4816
	250/4	6335	3616	3263
	220/4	3075	1522	2779
	209/3	5785	3102	2320
	156/3	5562	3650	2294
	100/2	2755	1522	2207
unilamellar	650/4	4529	1022	3434
	528/1	5954	3105	2049
	240/4	2678	1019	1678
	220/3	4453	3105	1348
	176/4	2178	874	1078
	150/2	4374	3105	1269
	147/2	2135	837	1035
	106/2	4053	3105	948

Eine direkte Gegenüberstellung der Messergebnisse ist in Abb. 16 gegeben. Sie demonstriert die deutlich höhere Chemilumineszenz von multilamellaren Liposomen gegenüber unilamellaren Liposomen.

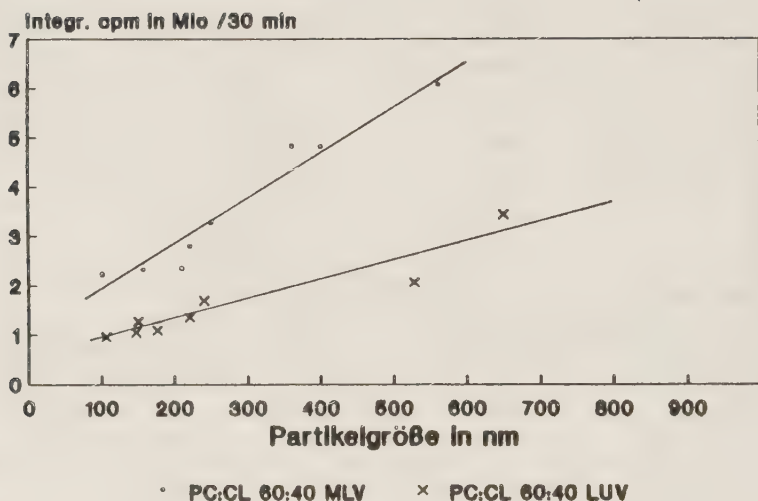


Abb. 16: Chemilumineszenz von uni- und multilamellaren Liposomen unterschiedlicher Größe

3.2.7. Abhängigkeit der Chemilumineszenz von der Größe der Phagozytosepartikel

In obigen Untersuchungen wurde parallel eine Größenabhängigkeit untersucht. Weiter wurde die Chemilumineszenz von Alveolarmakrophagen beim Kontakt mit Latexpartikeln unterschiedlicher Größe gemessen. Die verwendeten Partikel waren 100 nm, 600 nm und 1000 nm. Die 10 %ige Lösung wurde 1 : 10 mit Pbs-Puffer verdünnt. Der Verlauf der Chemilumineszenz ist in Abb. 17 dargestellt.

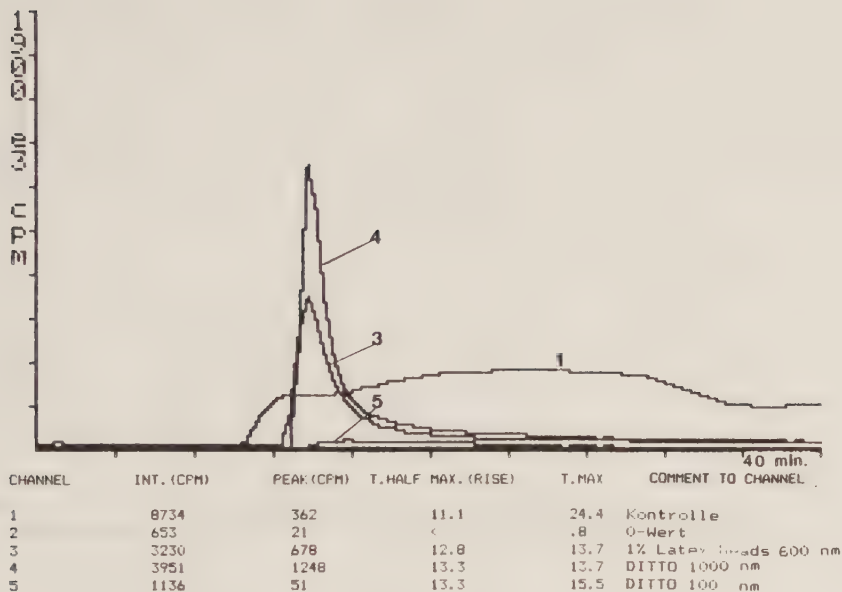


Abb. 17: Kurvenverlauf der Chemilumineszenz von Alveolar-makrophagen mit Latexpartikeln

Auffallend beim Reaktionsverlauf war der gleichartige Verlauf wie bei PC : CL, 60 : 40 Liposomen. Unterschiedlich war der verzögerte Anstieg des Peaks um etwa 3 min. Jedoch lief die Reaktion bedeutend schneller ab, wodurch das Peakmaximum nur um 1 min. später erreicht wurde, als bei Messungen mit Liposomen.

Den größenabhängigen Verlauf der Chemilumineszenz bei Verwendung von unilamellaren Liposomen unterschiedlicher Größe, die mittels unterschiedlicher Detergenzien hergestellt wurden, zeigten denselben Verlauf und vergleichbare Messwerte wie oben beschriebene unilamellare Liposomen. Es wurde deshalb auf eine gesonderte Darstellung verzichtet. Von Interesse ist die Größe der Liposomen je nach verwend-

tem Detergenz, siehe Tab. 11.

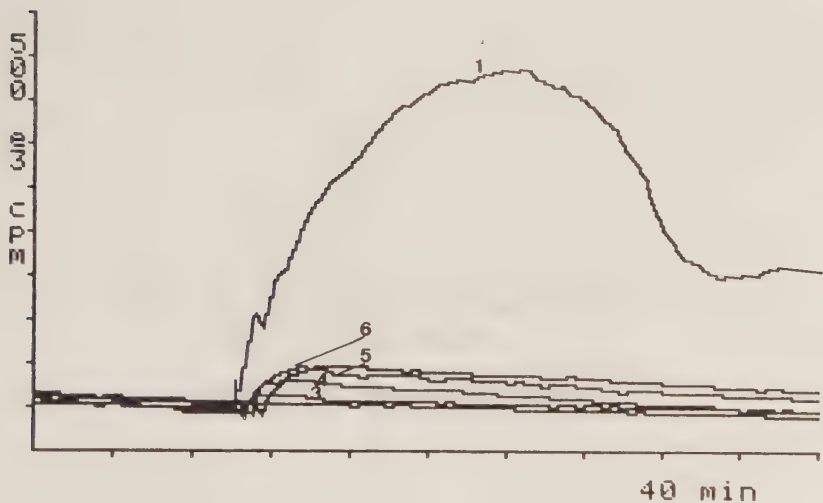
Tab. 10: Pipetierschema zur Herstellung von PC : CL,
60 : 40 Liposomen unterschiedlicher Größe mit-
tels unterschiedlicher Detergenzien

Detergenz	Menge	PC		CL	
		mg	ml	mg	ml
CgE ₄	15 mg	4,68	46,8	6,3	1,286
OG	15 mg	4,68	46,8	6,3	1,286
Na Cholat	8 mg	4,68	46,8	6,3	1,286

Tab 11: Größenbestimmung der mit Detergenzdialyse herge-
stellten Liposomen

Detergenz	Polydispersität	Größe in nm
CgE ₄	3/3/3	700/690/710
	4/4/3	680/670/670
	3/4/3	680/690/680
	3/4/3	670/670/680
Na Cholat	3/4/3	435/440/430
	4/4/3	420/400/400
	4/3/4	410/420/410
	4/4/4	420/420/420
OG	4/4/4	170/180/170
	2/2/2	185/185/180
	3/3/2	170/160/160
	2/3/3	160/160/170

Die größenabhängige Chemilumineszenz von multilamellären PC 100 % Liposomen unterschiedlicher Größe zeigt Abb. 18.



CHANNEL	INT. (CPM)	PEAK (CPM)	T. HALF MAX. (RISE)	T. MAX	COMMENT TO CHANNEL
1	10902	438	10.6	21.7	Kontrolle
2	2096	69	<	0	0-Wert
3	2258	69	<	0	PC 100% MLV 150/2
4	2428	81	<	12.8	DITTO 280/3
5	2806	97	<	13.3	DITTO 450/3
6	3087	100	<	14.6	DITTO 600/3
INTEGRATIONTIME FROM 0 TO 40 MIN					
ALL CPM-VALUES X1000					

Abb. 18: Größenabhängige Chemilumineszenz von PC 100 % Liposomen

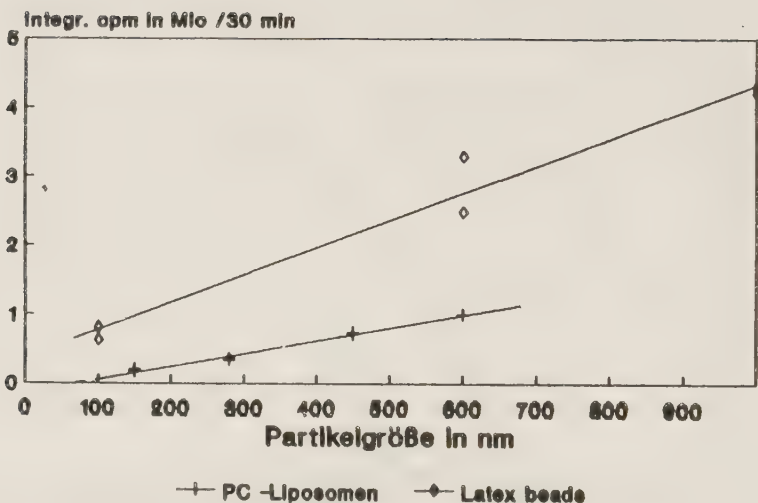
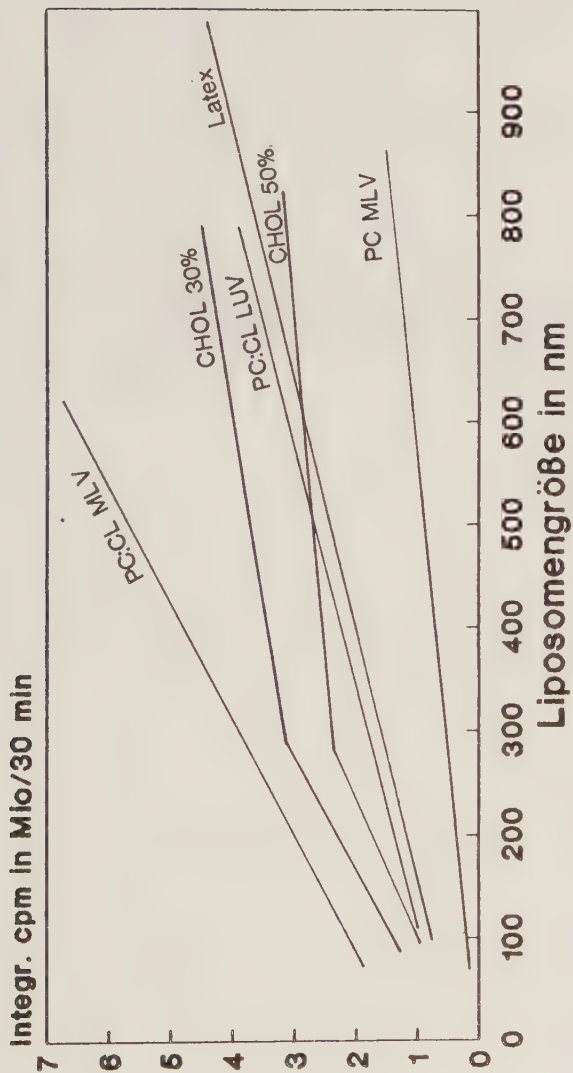
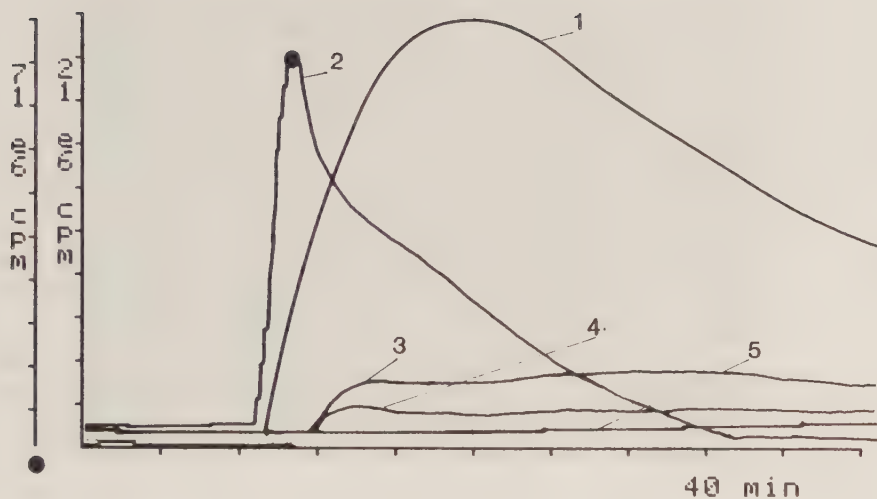


Abb. 19: Gegenüberstellung der Ergebnisse bei PC 100 % Liposomen und Latexpartikeln unterschiedlicher Größe

3.2.8. Gegenüberstellung der Ergebnisse bei Alveolarmakrophagen und Vergleich mit Granulozyten

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse bei Alveolarmakrophagen zeigt Abb. 20. In Abb. 21 und 22 sind die Ergebnisse bei Messungen mit Granulozyten dargestellt.





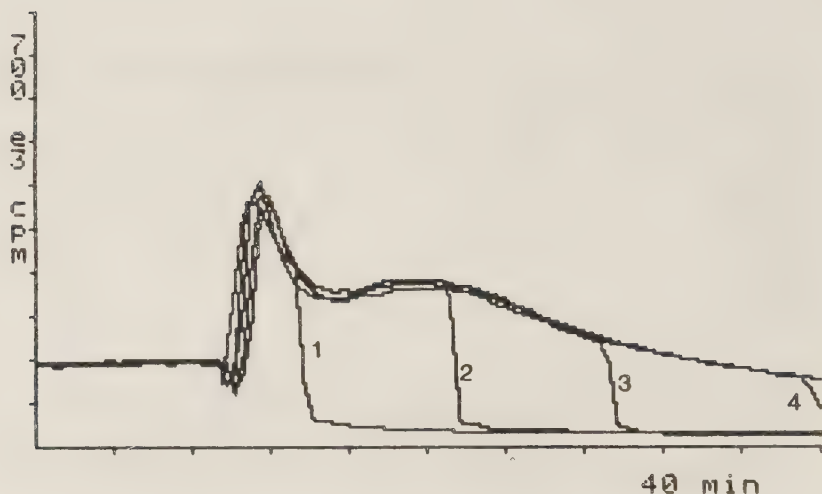
1. Zymosan
2. Latex beads 1000 nm
3. PC:CL 60:40 450 nm

4. PC:CL 60:40 LUV 450 nm
5. PC 100% 450 nm

Abb. 22: Verlauf der Chemilumineszenz von Granulozyten in Verbindung mit Liposomen und Latexpartikeln unterschiedlicher Größe

3.2.9. Fluoreszenzoptische Darstellung der Liposomenaufnahme

Die verwendeten carboxyfluoreszinhaltigen Liposomen waren multilamellar und hatten eine Größe von 240/4 nm. Den Kurvenverlauf beim Einsatz im Biolumaten zeigt Abb. 23.



CHANNEL	INT. (CPM)	PEAK (CPM)	T. HALF MAX. (RISE)	T. MAX	T. HALF MAX. (FALL)
1	2631	397	9.7	11.1	13.3
2	100	3	<	0	>
3	5967	504	10.2	11.5	20.8
4	6278	426	10.2	11.5	24.4
5	7567	406	10.6	11.5	25.7
6	7392	397	10.6	12	26.2

INTEGRATION TIME FROM 0 TO 40 MIN
ALL CPM-VALUES X1000

Abb. 23: Chemilumineszenz von Alveolarmakrophagen mit carboxyfluoreszinhaltigen Liposomen

Die Reaktion im Biolumaten, sowie die der Parallelansätze wurden zu verschiedenen Zeiten mit 60 μ l 3,7 % Formaldehyd abgebrochen. Von jedem Reaktionsschritt wurden Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie hergestellt. Bei drei Parallelversuchen ergaben sich jeweils vergleichbare Ergebnisse. Nachfolgende Abbildungen zeigen jeweils die Alveolarmakrophagen zu einer bestimmten Zeit der Reaktion.



Abb. 24: Aufnahme vor Zugabe von CF-Liposomen

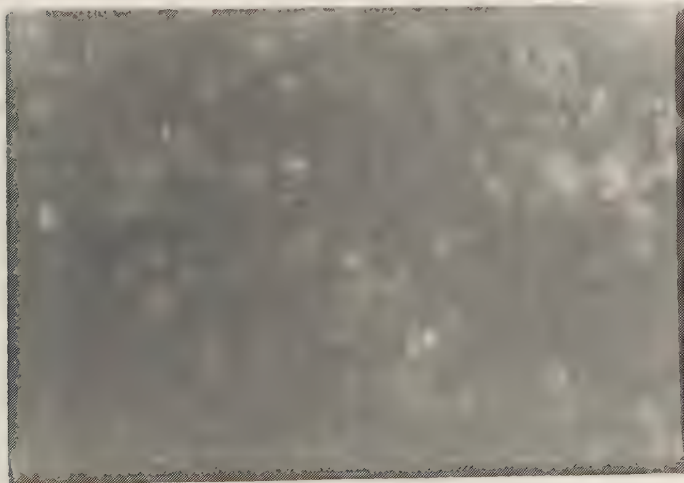


Abb. 25: Aufnahme direkt nach dem Peakmaximum (1)

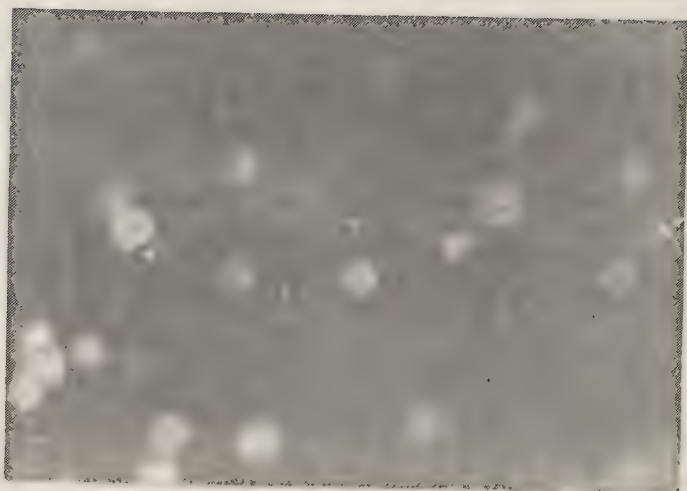


Abb. 26: Aufnahme 10 min. nach Reaktionsbeginn (2)

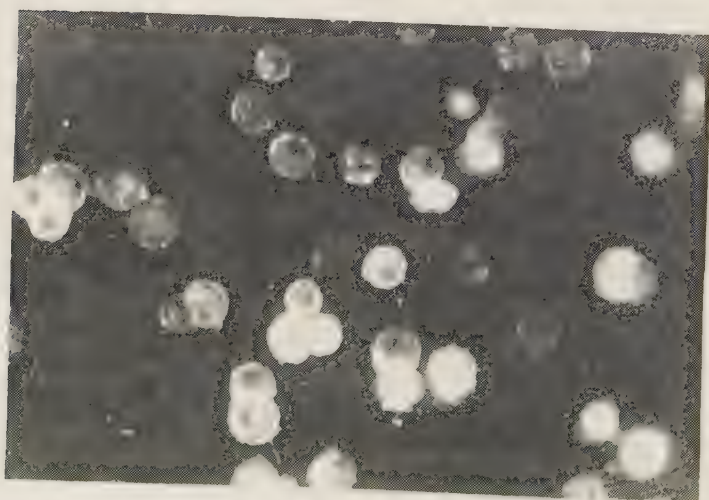


Abb. 27: Aufnahme 20 min. nach Reaktionsbeginn (3)

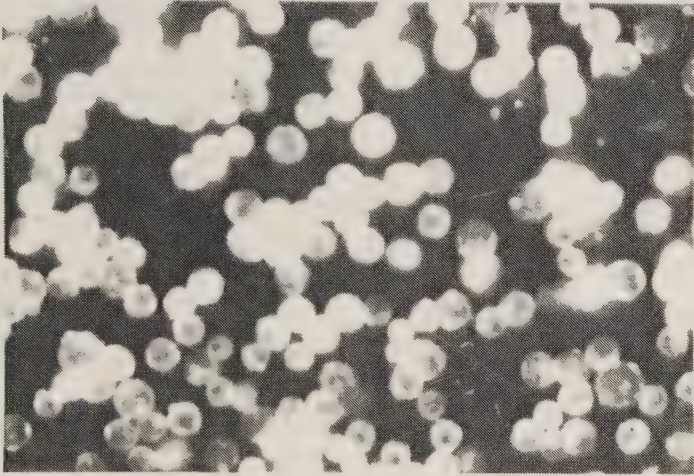
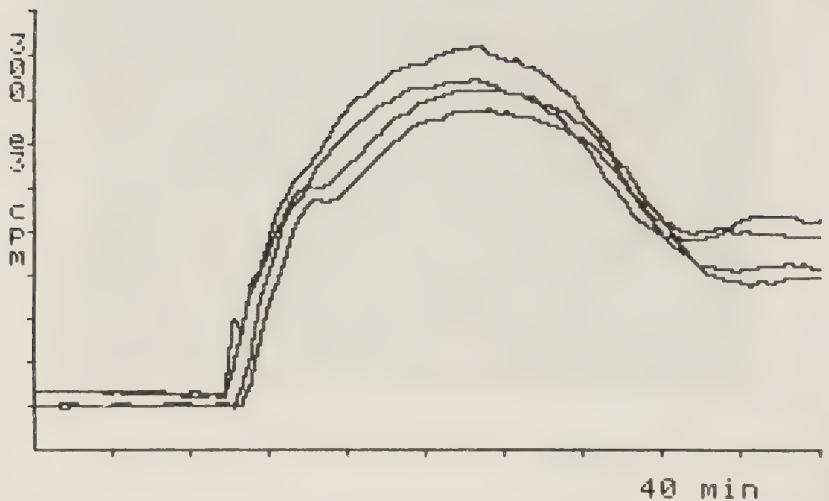


Abb. 28: Aufnahme 30 min. nach Reaktionsbeginn (4)

3.2.10. Steigerung der Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen

Im Chemilumineszenztest wurde die Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen von Tieren, die mit Inducern und Echinacin vorbehandelt waren, bestimmt. Nach einer Vorinkubation von 10 min. erfolgte die Zugabe von opsonisiertem Zymosan. Aus dem Verlauf der Kurven in Abb. 28 wird der zeitliche Verlauf der Phagozytose ersichtlich. Bei allen Präparaten war nach Zugabe von opsonisiertem Zymosan ein Anstieg der Chemilumineszenz zu sehen, der nach ca. 23 min sein Maximum erreicht hatte. Die halbe Anstiegszeit lag bei ca. 12 min.



CHANNEL	INT. (CPM)	PEAK (CPM)	T. HALF MAX. (RISE)	T. MAX	T. HALF MAX. (FALL)
3	6123	254	11.5	22.2	>
4	6565	277	11.5	22.6	>
5	5735	247	12	23.5	33.7
6	5471	234	12.4	23.1	>

INTEGRATIONTIME FROM 0 TO 40 MIN
ALL CPM-VALUES X1000

Abb. 29: Verlauf der Chemilumineszenz

Nachfolgende Tabelle gibt die Messwerte der Chemilumineszenz bei stimulierten und nichtstimulierten Tieren wieder. Es handelt sich jeweils um Doppelwerte von 4 gleichbehandelten Tieren.

Tab. 12: Chemilumineszenzwerte des Paramunisierungsversuchs

Werte als Integr. cpm x 1000/0,7 Mio. Zellen/30 min			
Imunstimulantien	Messwert	0-Wert	korrr. Wert
unbehandelt	6123	1036	5087
	6565	1036	5529
	6159	1036	5123
	5736	1036	4700
	7912	3190	4722
	8779	3190	5589
	5976	946	5030
	6166	946	5220
Plazebo 0,5 NaCl	7462	2196	5266
	7759	2196	5555
	6168	768	5400
	4759	761	4043
	7770	1770	6000
	7959	1770	6289
	5960	860	5120
	6590	860	5730
Pind-avi 0,5 ml	9161	1403	7758
	8136	1403	6733
	6807	865	5942
	7179	865	6314
	7179	761	6318
	7371	761	6610
	7322	810	6512
	7520	810	6710
Pind-avi 1,0 ml	7456	1356	6100

Fortsetzung Tab. 12:

	7065	1356	5709
	6245	1148	5100
	5974	1148	4509
	8285	1465	6820
	7871	1465	6406
	6686	760	5926
	6382	760	5622
E.coli 0,5 ml	7351	1600	5751
	6221	742	5507
	7639	1247	6392
	7402	1247	6155
	7092	780	6310
	6883	780	6103
	7192	1212	5980
	7304	1212	6092
E.coli+ L 0,5 ml	8485	1206	7279
	7628	1206	6422
	9375	1714	7661
	9560	1714	7846
	6552	580	5972
	5619	580	5619
	7946	730	7216
	7112	730	6382
Echinacin 0,5 ml	8633	1060	7109
	9168	1060	7944
	7380	805	6575
	7468	706	6765

Fortsetzung Tab. 12:

10174	3190	6984
8417	3190	5227
8174	1100	7074
7560	1100	6460

IN Abb. 30 werden die Mittelwerte obiger Messungen mit Standardabweichungen dargestellt.

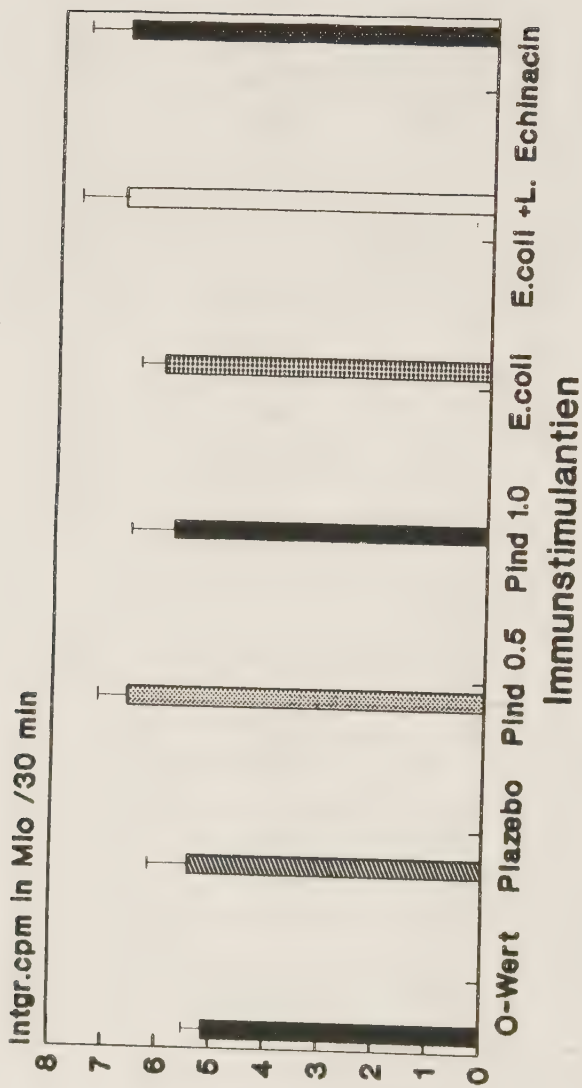


Abb. 30: Vergleich der Mittelwerte obiger Messungen

4.Diskussion

Der vielseitige Einsatz von Liposomen wurde beschrieben. Als Membranmodell können mit Hilfe von Liposomen Einflüsse auf Membranen und Wechselwirkungen mit Membranen erforscht werden. Das größte Interesse liegt derzeit in der Verwendung der Liposomen als Transportsystem und hier vor allem in der Tumorchemotherapie, sowie in der Immunologie, wo die Beeinflussung des Immunstatus untersucht wird. Ein weiteres Gebiet stellt die gezielte Chemotherapie dar. Beim Einsatz als "Carrier" ist die Verteilung im Organismus besonders wichtig. Mittels markierter Liposomen konnte festgestellt werden, daß die Liposomen sehr schnell in Milz und Leber akkumulieren (MC Douglas et al. 1974) und von Gewebsmakrophagen eliminiert werden (Gregoriadis et al. 1973). In weiteren Untersuchungen wurden die Gewebsverteilung, sowie die Eliminationsrate in Abhängigkeit von Größe, Ladung, Lipidzusammensetzung und den eingeschlossenen Substanzen untersucht (Gregoriadis et al. 1977). Fidler et al. befaßten sich 1980 vorwiegend mit der Aufnahme von Liposomen in der Lunge und hier in den Alveolarmakrophagen.

Der Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten der Liposomen stehen die zellulären Abwehrmechanismen des Organismus entgegen. Die Gewebsmakrophagen, die als Einheit das RES (Reticuloendotheliales System) repräsentieren, sind die Ursache für die rasche Elimination der Liposomen aus dem Organismus. Dies macht die Untersuchung der Phagozytose von Liposomen durch mononukleäre Zellen zu einem wichtigen Teil der Liposomenforschung.

Die Phagozytose wurde als ein Geschehen beschrieben, das sich vom ersten Kontakt des Phagozyten mit dem zu phagozy-

tierenden Partikel bis zu dessen Ingestion in eine Reihe von Schritten unterteilen läßt. Da jeder heute zur Verfügung stehende Phagozytostest nur einen Teilkomplex dieser Abläufe erfaßt (Roth und Kaerberle 1981), ist ein Überblick über das insgesamt sehr komplexe Geschehen nur mit Hilfe mehrerer konkurrierender In-vitro Tests möglich. Hierbei wird die Problematik der Interpretation von Phagozytostests deutlich, die als Kriterien für die allgemeine Phagozytosefähigkeit herangezogen werden, aber nur ganz spezielle biochemische Vorgänge messen. Sicher ist, daß der oxidative Metabolismus beim gesamten Phagozytosevorgang eine dominierende Rolle spielt (Smith 1982). Die Verwendung der Chl (Chemilumineszenz) als Test für die Phagozytosefähigkeit und nicht nur für die Phagozytoseaktivität ist infolge der einfachen Anwendung von Interesse. Obwohl gerade bei indirekten Tests die Einflüsse von Medien und Präparationsmethoden besonders groß sind. Die Problematik bei Verwendung der Chl als indirekter Phagozytostest liegt darin, daß genaue biochemische Abläufe der Chl mit Luminol noch teilweise unklar sind (Zgliczynski 1985). Sicher ist, daß während des Phagozytosevorgangs über das instabile Superoxid Anion eine Reihe von Sauerstoffradikalen entstehen, die nach der Koppelung an Luminol als Lichtblitze gemessen werden können. Aber trotzdem ist die Chl kein eigentlicher Parameter für den oxidativen Metabolismus des Phagozyten. De Chatelet (1982) wies die völlige Abhängigkeit der Luminol-vermittelten Chl von dem Enzym MPO (Myeloperoxidase) nach. Rosen (1979) spricht aber diesem Enzym eine überragende Bedeutung bei der Abtötung von Mikroorganismen zu, was ein wichtiger Bestandteil des Phagozytosevorgangs ist. Wichtig bei der Chl wie auch bei den anderen Phagozytostests ist der Vergleich mit Untersuchungen, die

auf anderen Testsystemen beruhen. Bei der Chl in Zusammenhang mit der Phagozytose von Liposomen ist vor allem die Frage nach der Liposomenaufnahme von Bedeutung. Wichtig ist es, reine Abläufe an der Membran auszuschließen und eine Partikelaufnahme nachzuweisen. Phorbol-Myristal-Acetat bewirkt bei Granulozyten einen charakteristischen initial explosionsartigen Anstiegs des oxidativen Stoffwechsels und der Chl (Szejda 1984). Bei Alveolarmakrophagen kommt es hingegen nur zu einem stetigen Anstieg, dessen Plateau nach 20 min. erreicht ist.

Über die Chl von Blutmonozyten liegen nur ungenaue Kenntnisse vor, da mit ihrer Isolierung aus den mononukleären Zellen offensichtlich ein Verlust der Fähigkeit zur Chl einhergeht (Ernst et al. 1984). Deshalb hat sich die Verwendung von AM (Alveolarmakrophagen) als günstig erwiesen. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von Granulozyten war interessant, da die Chl von Granulozyten derzeit am genauesten untersucht ist. Eine Gegenüberstellung war jedoch nur in getrennten Messungen möglich, da die Chl-Antwort der Granulozyten um ein 40 faches höher war. In analoger Weise zu den Messungen bei Granulozyten (Bruchelt und Schmidt 1984), konnte bei AM eine erhöhte Chl bei Steigerung der Zellzahl und gleichbleibender Menge an Phagozytosepartikel nachgewiesen werden.

Die Erhöhung der Liposomenmenge bei gleichbleibender Zellzahl ließ das Entstehen eines zweiten Peaks erkennen, der mit steigender Liposomenmenge anstieg, wobei parallel dazu der erste Peak kleiner wurde. Der genaue Sachverhalt konnte nicht geklärt werden. Möglich wäre eine Art Quencheffekt der Liposomen infolge steigender Trübung der Lösung, vergleichbar mit dem vermuteten Quencheffekt bei Vollblutchemilumineszenzmessungen mit Zymosan (Bruchelt und Schmidt

1984). Gleichfalls ist das Umschalten der Zellen von einem schnellen Aufnahmemechanismus auf einen langsameren in Betracht zu ziehen, der infolge eines entstehenden Energie-defizits auftritt und der Ankurbelung von Energiereserven dient.

Das Hauptziel der Arbeit lag in der Untersuchung der Phagozytose von Liposomen unterschiedlicher Größe, Lamellarität und Lipidzusammensetzung. Eine Steigerung des Cardiolipin-gehalts in der Liposomenmembran brachte eine beträchtliche Steigerung der Chl. So zeigten reine Cardiolipin-Liposomen im Gegensatz zu reinen PC-Liposomen eine 10 - 12 fache Chl. Für Liposomen mit mehr als 20 - 30 % Cardiolipin in der Membran war die Entstehung eines steil ansteigenden und steil abfallenden Peaks in der Chl-Antwort typisch. Bei reinen PC-Liposomen war hingegen ein kurzer Anstieg mit anhaltendem Plateau zu erkennen. Ob hierbei die negative Ladung (vergl. Silverstein et al. 1977) von Cardiolipin ausschlaggebend für eine stärkere Chl ist, oder ob evtl. spezielle Rezeptoren vorliegen, ist unbekannt. Bei Granulozyten konnte dieser Effekt nicht in dem Maße nachgewiesen werden. Hier stellt sich die Frage, ob evtl. AM einen Rezeptor besitzen, der bei Granulozyten nicht vorhanden ist. Bei der Phagozytose von Partikeln unterschiedlicher Größe konnte eine Steigerung der Chl mit dem Anstieg der Partikelgröße, bei Granulozyten und auch bei AM, beobachtet werden. Um die kumulative Wirkung der negativen Lipidladung auszuschließen, wurde zum Vergleich mit Latexpartikeln unterschiedlicher Größe gemessen. Hierbei ergaben sich sowohl bei Granulozyten als auch bei AM vergleichbar hohe Anstiege der Chl bei steigender Partikelgröße. Bei Latexpartikeln ist ebenfalls unklar ob die Phagozytose durch Oberflächenmechanismen (Silverstein et al. 1977) zustande

kommt, oder ob gar spezifische Rezeptoren beteiligt sind (Dean und Jessup 1985).

Unterschiede in der Lamellarität der Liposomen führte zu Unterschieden in der Chl-Antwort. So zeigten multilamellare Liposomen gleicher Lipidzusammensetzung gegenüber unilamellaren Liposomen eine höhere Chl. In der Literatur waren eine Reihe von Arbeiten zu finden, die vergleichbare Ergebnisse mit anderen Phagozytostests nachgewiesen haben. Hunt et al. (1979) stellten fest, daß sich große multilamellare Vesikel vorwiegend in Leber, Lunge und Milz anreichern, während kleine Vesikel eine bedeutend höhere Gewebsverteilung aufwiesen (Juliano und Stamp 1978). Eine Arbeitsgruppe um Fidler stellte in mehreren Arbeiten fest, daß negativ geladene multilamellare Liposomen mit einer Lipidzusammensetzung von PS : PC (Phosphatidylserin : Phosphatidylcholin), im molaren Verhältnis 3 : 7, sich vorwiegend in den AM der Lunge anreichern. Weiter erkannten sie, daß reine PC-Liposomen (neutral) schlechter aufgenommen werden. Der Nachweis erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie, Elektronenmikroskopie und durch die Verwendung von MDP (Muramyl-dipeptid) und Lymphokinen. Letztere bewirken eine bedeutend höhere Steigerung der Infektabwehr über Liposomen als die freie Substanz, Fidler et al. 1980 und 1981, Key et al. 1982, Raz et al. 1981, Schroit und Fidler 1982, Hsu MJ 1982.

Unter Verwendung von Stearylamin zur Liposomenherstellung zeigten Schwendener et al. (1984) vergleichbare Effekte von positiv geladenen Liposomen.

Bei der Verwendung von multilamellaren Liposomen mit einem Cholesteringehalt von 30 % in der Mischung PC/CL/CHOL wurde eine geringere Chl als bei Liposomen ohne Cholesterin festgestellt. Bei Erhöhung auf 50 % kam es zu einem weiteren

Abfall der Chl. Demel stellte 1976 fest, daß Liposomenmembranen durch Cholesterin dichter gepackt werden. Classen und Rooijen entdeckten 1984, daß cholesterinhaltige Liposomen schlechter von Makrophagen phagozytiert werden.

Cardiolipinliposomen werden angeblich in vermindertem Umfang vom RES abgefangen, was Hnatowich und Gassy 1980 herausgefunden haben. Weiter ist bemerkenswert, daß Liposomen mit einer starren Membran schlechter phagozytiert werden, wenngleich bei alternden Erythrozyten davon ausgegangen wird, daß diese gerade wegen ihrer starren Membran vom RES abgefangen werden.

Insgesamt ergaben sich eine große Zahl von Übereinstimmungen der Ergebnisse mit Versuchen, die auf andere Untersuchungsmethoden als die Chl basieren. Um jedoch die Chl als Test für die Phagozytose von Liposomen im RES anwenden zu können, gäbe es noch eine Vielzahl von Fragen zu klären. Wichtig wäre es zu wissen, wie sich Liposomen im Serum verändern und welchen Einfluß dies auf die Phagozytose hat. Den genauen Reaktionsablauf der Chl zu untersuchen stellt eine der wichtigsten Aufgaben dar. Derzeit muß zur Chl ein anderer Phagozytostest parallel laufen, um eine reine Membranstimulation des Phagozyten ohne Partikelaufnahme ausschließen zu können.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zeigten eine deutliche Bindung und Aufnahme der Liposomen. Auffallend ist dabei die zeitliche Verschiebung zwischen dem Peak der Chl und dem Auftreten der Liposomen in den AM. Miles et al. (1978) erkannten ebenfalls eine zeitliche Verschiebung zwischen Chl-Antwort und Partikelaufnahme bei Messungen mit opsonisiertem Zymosan. Sie nahmen an, daß die Reaktion zwischen reaktiven Sauerstoffformen und Zymosan im Extrazellulärraum auftritt.

Weiter konnte in der Arbeit am Beispiel bakterieller Ly-
sate, einem strahleninaktivierten Virus (Pind-avi) und
Echinacin die paraspezifische Wirkung dieser Präparate
untersucht werden. Ziel war es die Steigerung der Phagozy-
toseaktivität mittels Chl zu untersuchen. Problematisch war
hierbei, wie auch bei anderen Tests, der Einfluß der Umwelt
auf die Phagozytoseaktivität von Phagozyten. So können
kleinste Veränderungen in der Haltung (Futterumstellung,
Infektionen, Personenverkehr u.a.) die Tiere belasten und
damit die Phagozytoseaktivität beeinflussen. Gegenüber
Untersuchungen mit Granulozyten ist es bei AM nicht möglich
Parallelwerte im stimulierten und nicht stimulierten
Zustand zu machen, da die Tiere jeweils getötet werden.
Dies hat zur Folge, daß individuelle Schwankungen mit auf
die Ergebnisse einwirken. Eine Gegenüberstellung der
Mittelwerte von je vier Doppelwerten zeigte bei den Präpa-
raten Echinacin und E.coli + Lysozym die größte Stimulier-
ung. Pind-avi zeigte ebenfalls eine deutliche Erhöhung der
Phagozytoseaktivität, wobei eine höhere Dosierung negativen
Einfluß hatte. Die immunstimulierende Wirkung konnte bei
allen Präparaten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bei
lokaler Anwendung der Präparate wäre von großem Interesse,
stellt jedoch wegen Fehlen eines geeigneten Tiermodells
große Probleme dar. Die nasale Applikation bei kleinen Ver-
suchstieren ist schwer zu standardisieren. Der Einsatz
eines Tracheotubus ermöglicht zwar eine individuelle Do-
sierung, ist aber bei häufiger Applikation problematisch.
Da durch Streß und Mikroläsionen die Tiere stark belastet
werden, was zu Verfälschungen der Ergebnisse führt. Zur
Umgehung dieser Probleme wurden Aerosole erprobt. Rættig
wies hiermit 1976 gute Erfolge auf. Sehr großes Interesse
zeigt die Anwendung von Lymphokinen und Muramyl-dipeptid zur

Steigerung der unspezifischen Abwehr. Fidler et al. (1980-1981) wiesen nach, daß in Liposomen verabreichte Lymphokine und Muramyldipeptid bedeutend wirkungsvoller sind und zum Teil nur auf diesem Wege wirken. Der Einschluß oben untersuchter Substanzen in Liposomen wäre interessant, um die lokale Stimulierung von Alveolarmakrophagen zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Phagozytose von Liposomen mittels Chemilumineszenz untersucht. Die Liposomenmembranen bestanden aus PC (Phosphatidylcholin) und CL (Cardiolipin) in einem unterschiedlichen Verhältnis.

Der Beginn der Phagozytose ist von einem stark ansteigenden oxidativen Stoffwechsel des Phagozyten gekennzeichnet, den dieser zur Bildung von für Mikroorganismen toxischen Sauerstoffspezies benützt. Diese Tatsache wurde genutzt, um indirekt die Phagozytose über die Luminol-abhängige Chemilumineszenz zu messen. Als direkte Methode wurde der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der Liposomenaufnahme durchgeführt, um eine Stimulierung des Phagozyten als reine Membranreaktion, ohne Partikelaufnahme, auszuschließen. Dies wurde mit Hilfe carboxyfluoreszinhaltiger Liposomen untersucht.

Es wurde eine Dominanz von Granulozyten bei der Luminol-abhängigen Chemilumineszenz nachgewiesen. Alveolarmakrophagen zeigten beim Kontakt mit opsonisiertem Zymosan eine viel geringere Chemilumineszenz. Beim Einsatz unterschiedlicher Liposomenmengen konnte das Auftreten und die Verstärkung eines zweiten Peaks beobachtet werden. Durch die ganze Reihe von Versuchen wurde stets eine, von der Größe der Phagozytosepartikel abhängige, Chemilumineszenz nachgewiesen. Bei Granulozyten ließen sich vergleichbare Ergebnisse nachweisen. Eine Steigerung der Chemilumineszenz wurde bei erhöhtem Anteil von CL in der Liposomenmembran beobachtet. Bei multilamellaren Liposomen war im Gegensatz zu unilamellaren Liposomen ebenfalls eine Erhöhung zu erkennen. Eine Erhöhung des Cholesteringehalts in der Liposo-

menmembran führte zur Erniedrigung der Chemilumineszenz. Die Aufnahme von Latexpartikeln zeigte bei Alveolarmakrophagen, wie auch bei Granulozyten eine deutliche größenabhängige Chemilumineszenz. Auffallend war der anders gear- tete Verlauf der Chemilumineszenz von Granulozyten, die mit CL-haltigen Liposomen inkubiert wurden. Im Verhältnis zu den Alveolarmakrophagen brachte bei den Granulozyten der CL-Gehalt der Liposomen einen geringeren Anstieg der Chemi- lumineszenz. Die Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop zeigten eine zeitliche Verschiebung zwischen Chemilumineszenz und Partikelaufnahme.

Weiter wurde durch vergleichende Untersuchungen bei Ratten die immunstimulierende (paramunisierende) Wirkung von Ein- fachinducern aus Lysaten von E.coli und E.coli + Lysozym, sowie dem viralen Inducer Pind-avi geprüft. Als pflanz- liches Präparat wurde Echinaquin eingesetzt. Die Wirksam- keitsbestimmung erfolgte durch Messung der Phagozytoseak- tivität mittels Chemilumineszenz. Eine Steigerung konnte bei allen Präparaten beobachtet werden, jedoch war zu er- kennen, daß E.coli + Lysozym eine bessere Wirkung zeigte als nur E.coli. Bei einer doppelten Dosis von Pind-avi wurde eine geringere Steigerung der Phagozytoseaktivität gegenüber der Einfachdosis beobachtet.

6. Summary

Chemiluminescence measurements during the phagocytosis of liposomes by alveolar macrophages.

In this study, the phagocytosis of liposomes was examined using chemiluminescence. The liposomal membrane was composed of phosphatidylcholine and cardiolipin in different proportions. The beginn of phagocytosis is characterized by a strongly increased oxidative metabolism. This was used to measure phagocytosis indirectly by luminol-dependent-chemiluminescence.

In order to exclude a reaction purely at the phagocyte membrane, without particle uptake, uptake of liposomes was determined directly under the fluorecence microscope. This was done with the help of carboxyfluoresceine containing liposomes.

The dominance of granulocytic luminol-dependent chemiluminescence was demonstrated. Alveolar macrophages showed a much smaller chemiluminescence when contacted with opsonised zymosan. Using different quantities of liposomes, the occurence and the intensification of a second peak could be observed. In all of the tests, a phagocytose-particle dependent chemiluminescence was constantly observed. Nearly the same results could be proved for granulocytes. An increase of the chemiluminescence was observed when the liposomal membrane contained cardiolipin at a high proportion. MLV also showed an increase in contrast to LUV. An increase of the content of cholesterol in the liposome membranes resulted in a decrease of chemiluminescence. The uptake of latex particles by alveolar macrophages as well

as by granulocytes showed a distinct size dependent chemiluminescence. A different kind of chemiluminescence reaction was observed for granulocytes which were incubated with cardiolipin-containing liposomes. There was a smaller increase of chemiluminescence by granulocytes in comparison to alveolar macrophages, at the same liposomal cardiolipin concentration.

The fluorescence micrographs showed a temporal deferment between chemiluminescence and particle uptake.

The immune stimulating effect of monoinducers, consisting of E.coli and E.coli + lysozym lysate, as well as of the viral inducer Pind-avi were verified in comparing examinations of rats. As a plant product Echinacin was tested. Effectiveness was measured by phagocytic activity using chemiluminescence. An increase could be observed for all preparations, but E.coli + lysozym showed a better reaction than pure E.coli. At a double dose of Pind-avi, a smaller increase of a phagocytic activity was observed, in comparison to the single dose.

Literaturverzeichnis

- Allen, R.C., Stjernholen, R.L., Steele, R.H., (1972)
Evidence for the generation of an electronic excitation
stafel in human polymorphonuclear leucocytes and its
participation in bactericidal activity.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47 : 679-684
- Allen, R.C., Loose, L.D., (1976)
Phagocytic activation of a luminol-dependent chemilumi-
nescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 69 : 245 - 252
- Allison, A.C., Gregoriadis, G., (1974)
Liposomes as immunological adjuvants.
Nature 252 : 252
- Alving, C.R., Steck, E.A., (1979)
The use of liposome - encapsulated drugs in leishma-
niasis.
Trends in Biochem. Sci. 4 : 175 - 177
- Alving, C.R., (1982)
Therapeutic potential of liposomes as carriers in
leishmaniasis, malaria, and vaccines.
In: Targeting of drugs (G. Gregoriadis, J. Senior,
A. Trouet, Eds.) Plenum Publishing Corporation
- Babior, B.M., (1978)
Oxygen dependent microbial killing by phagocytes.
New Engl. J. Med. 298 : 659 - 668, 721 - 725
- Bangham, A.D., Stadish, M.M., Watkins, I.C., (1965)
Diffusion of univalent ions across the lamellae of
swollen phospholipids.
I. Med. Biol. 13 : 238 - 252
- Bangham, A.D., (1972)
Lipid bilayers and biomembranes.
Ann. Rev. Biochem. 41 : 753 - 776

- Barenholtz, S., Anselm, S., Lichtenberg, D., (1979)
A new method for preparation of phospholipid vesicles
(liposomes) french press
FEBS Letters Vol. 99 : 210
- Batzri, Sh., Korn, E.D., (1973)
Single bilayer liposomes prepared without sonication.
Biochimica et Biophysica Acta 298 : 1015 - 1019
- Beall, G.D., Repine, J.E., Hoidal, I.R., Rasp, F.I., (1977)
Chemiluminescence by human alveolar macrophage: Stimu-
lation with heat killed bacteria or phorbol myristate
acetate.
Inf. Imm. 17 : 117 - 120
- Bestermann, J.M., Low, R.B., (1983)
Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membran
dynamics.
Biochem. J. 210 : 1 - 13
- Boym, A., (1968)
Seperation of leukocyte from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97) : 77 - 79
- Bruchelt, G., Schmidt, K.H., (1984)
Chemiluminescence during phagocytosis.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 22, No.1 : 5 - 8
- Brunner, J., Skrabel, P., Hauser, H., (1976)
Single bilayer vesicles prepared without sonication
physico - chemical properties.
Biochemica. et Biophysica Acta 455 : 322 - 331
- Chari - Bittron, A., Motola, L., Kaphun, A., Sahor, A.,
(1983)
Correlation between chemiluminescence and rate of
zymosan uptake by rat alveolar macrophages.
Cell. Bio. Int. Rep. 7 (4) : 303 - 310
- Cheson, B.D., Christensen, R.L., Sperling, R.,
Kohler, B.E., Babior, B.M., (1976)
The origin of the chemiluminescence of phagocytosing
granulocytes.
J. Clin. Invest. 58 : 789 - 796

- Claassen, E., Van Rooijen, N., (1984)
The effect of elimination of macrophages on the tissue distribution of liposomes containing (3H) methotrexate.
Biochim. Biophys. Acta. 802 (3) : 428 - 434
- Deamer, D., Bangham, A.D., (1976)
Large volume liposomes by an ether vaporization method.
Biochimica et Biophysica Acta 443 : 629 - 634
- Dean, R.T., Jessup, W., (1985)
Mononuclear phagocytes: Physiology and pathology.
In research monographie in cell and tissue physiology.
Herausgegeben von Dingle und Gordan.
Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford
- Dearden, S., Hunter, Th.F., Philip, J., (1982)
A rapid method for the preparation of microvesicles of egg yolk lecithin.
Biochimica et Biophysica Acta 689 : 415 - 418
- De Chatelet, L.R., Long, G.D., Shirley, P.S., Bass, D.A., Thomas, M.J., Hendersen, F.W., Cohen, M.S., (1982)
Mechanism of the luminol - development chemiluminescence of human neutrophils.
J. Imm. 129 : 1589 - 1593
- Deenen, L.L.M. von, (1972)
Phospholipide - Beziehungen zwischen ihrer chemischen Struktur und Biomembranen.
Naturwissenschaften 59 : 485 - 491
- DeLuca, M.A., (1978)
Bioluminescence and chemiluminescence.
Methods of Enzymology Vol. 57 (39) : 462 - 495
- DeLuca, M.A., McElroy, W.D., (1986)
Bioluminescence and chemiluminescence.
Methods of Enzymology Vol. 133 Part B. (38) : 475

- Demel, R.A., Jansen, J.W.C.M., van Dijck, P.W.M.,
van Deenen, L.L.M., (1977)
The preferential interaction of cholesterol with
different classes of phospholipids.
Biochem. Biophys. Acta 465 : 1 - 10
- Dervichian, D.G., (1964)
The physical chemistry of phospholipids.
Progr. Biophys. Mol. Biol. 14 : 265 - 342
- Düzgünes, N., Ohki, Sh. (1981)
Fusion of small unilamellar liposomes with phospholipid
planar bilayer membranes and large single - bilayer
vesicles.
Biochemica et Biophysica Acta 640 : 734 - 747
- Enoch, H.G., Strittmatter, Ph., (1979)
Formation and properties of 1000 Å-Diameter,
single - bilayer phospholipid vesicles.
Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 145
- Ernst, M., Lange, A., Flad, H.D., Havel, A., Ennen, J.,
Ulmer, A.J., (1984)
Dissociation of responses measured by natural cytotoxicity
by a microsomal peroxidase.
Europ. J. Imm. 14 : 634
- Fidler, I.J., Raz, A., Fogler, W.E., Kirsh, R.,
Bugelski, P., Poste, G., (1980)
Design of liposomes to improve delivery of macrophage-
augmenting agents to alveolar macrophages.
Cancer Res. 40 (12) : 4460 - 4466
- Fidler, I.J., (1980)
Therapy of spontaneous metastases by intravenous
injection of liposomes containing lymphokines.
Science 208 : 1469 - 1471
- Fidler, I.J., (1981)
The in situ induction of tumoricidal activity in
alveolar macrophages by liposomes containing muramyl
dipeptide is a thymus -independent process.
J. Immunol. 127 : 1719 - 1720

- Fidler, I.J., Sone, S., Fogler, W.E., Barnes, Z.L. (1981)
Eradication of spontaneous metastases and activation of
alveolar macrophages by intravenous injection of lipos-
omes containing muramyl dipeptide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (3) : 1680 - 1684
- Fischer, R.W., James, I.C., (1978)
Lateral diffusion of the phospholipid molecule in
dipalmitoyl - phosphatidylcholin bilayers. An investi-
gation using nuclear spin - lattice relaxation in the
rotating frame.
Biochemistry 17 : 1177 - 1183
- Fischer, H., Staudinger, H.J., (1981)
Chemilumineszenz, ein Indikator für Zellaktivierung?
Klin. Wschr. 59 : 199 - 201
- Fraley, R., Papahadjopoulos, D., (1982)
Liposomes: The development of a new carrier system for
introducing nucleic acids into plant and animal cells.
In: Current Topics in Microbiology and Immunology,
Vol. 96 (W. Henle, Ed.), Springer - Verlag, Berlin,
Heidelberg: 171 - 191
- Gregoriadis, G., (1973)
Drug intrapment in liposomes.
FEBS Letter 36 : 292 - 296
- Gregoriadis, G., Neerunjun, E.D., Hunt, R., (1977)
Fate of a liposome - associated agent injected into
normal and tumor - bearing rodents. Attempts to improve
localization in tumor tissues.
Life Sci. 21 : 357 - 369
- Harrison Roger (1977)
Biologische Membranen.
1. Aufl. Fischer Stuttgart, New York : 7 - 11
- Hnatowich, B.J., Glassy, B., (1980)
Investigations of a new highly negative liposome with
improved body distribution for imaging.
J. Nucl. Med. 21 : 662 - 669

- Hsu, M.J., Juliano, R.L., (1982)
Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system. Nonspecific and receptor - mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages.
Biochim. Biophys. Acta 720 (4) : 411 - 419
- Huang, C., (1969)
Studies on phosphatidylcholine vesicles formation and physical characteristics.
Biochemistry 8 : 344 - 352
- Hunt, C.A., Rustum, J.M., Mayhew, E., Papahadjopoulos, D., (1979)
Retention of cytosine arabinoside in mouse lung following intravenous administration in liposomes of different size.
Drug Metab. Dispos. 17 : 124 - 128
- Johnson, S.M., Bangham, A.D., Hill, M.W., Korn, E.D., (1971)
Single - bilayer liposomes.
Biochem. Biophys. Acta 233 : 820 - 826
- Juliano, R.L., Stamp, D., (1975)
The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 63 : 651 - 658
- Karlson, P., (1980)
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.
Thieme Verlag Stuttgart : 256 + 292
- Key, M.E., Ialmadge, J.E., Fogler, W.E., Bucana, C., Fidler, I.J., (1982)
Isolation of tumoricidal macrophages from lung melanoma metastases of mice treated systemically with liposomes containing a lipophilic derivative of muramyl dipeptide
JNCI. 69 (5) 1198
- Kornberg, R.D., McConnell, H.M., (1971)
Inside - outside transitions of phospholipids in vesicles membranes.
Biochemistry 10 : 1111-1120

- Kremer, J.M.H., Esker, M.W.J., Pathmamanoharan, D.,
Wiersema, P.H., (1977)
Vesicles of variable diameter prepared by a modified
injection method.
Biochemistry Vol. 16, No. 17 : 3932 -3935
- Ladbrook, B.D., Williams, R.M., Chapman, D., (1968)
Studies on lecithin - cholesterol - water interactions
by differential scanning calorimetry and x-ray
diffraction.
Biochem. Biophys. Acta 150 : 330 - 340
- McIntosh, T.J., (1978)
The effect of cholesterol on the structur of phosphati-
dylcholin bilayers.
Biochem, Biophys, Acta 513 : 43 - 58
- McPhail, L.C., Snyderman, R., (1983)
Activation of the respiratory burst enzyme in human
polymorphnuclear leucocytes by chemoattractants and
other soluble stimuli - evidence that the same oxidase
is activated by different transductional mechanisms.
J. Clin. Invest. 72 : 192 - 200
- Miles, P.R., Castranova, V., Lee, P., (1977)
Reactive forms of oxygen and chemiluminescence in
phagozytosing rabbit alveolar macrophages.
Am. J. Physiol. 235 (3) : 103 -108
- Miller, D.C., Dahl, G.P., (1982)
Early events in calcium - induced liposome fusion.
Biochemica et Biophysica Acta 689 : 165 - 169
- Milsmann, M.H.W., Schwendener, R.A., Weder, H.-G. (1978)
The preparation of large single - bilayer liposomes by
a fast and controlled dialysis.
Biochemica et Biophysica Acta 512 : 147 - 155
- Ohki, Sh. (1982)
Mechanism of divalent ion - induced phosphatidyl-
serine membrane fusion.
Biochemica et Biophysica Acta 689 : 1 - 11

- Okada, N., Jasuda, T., Tsumita, T., Okada, H., (1983)
Differing reactivities of human and guinea pig complement on haptenized liposomes via the alternative pathway.
Molec. Immunol. 20 : 857 - 864
- Oldfield, E., Chapman, D., (1972)
Dynamics of lipids in membranes heterogeneity and the role of cholesterol.
FEBS Letter 23 : 285 - 297
- Olson, F., Hunt, C.A., Szoka, F.C., Vail, W.J., Papahadjopoulos, D., (1979)
Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes.
Biochimica et Biophysica Acta 557 : 9 - 23
- Owicki, J.C., Springgate, M.W., McConnell, M.H., (1978)
Theoretical study of protein - lipid interactions in bilayer membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. 75 : 1616 - 1619
- Papahadjopoulos, D., Miller, N., (1967)
Phospholipid model membranes. I Structural characteristics of hydrated liquid crystals.
Biochim. Biophys. Acta 135 : 624 - 638
- Papahadjopoulos, D., Heath, T., Martin, F., Fraley, R., Straubinger, R., (1982)
Development of liposomes as an efficient carrier system. New methodology for cell targeting and intracellular delivery of drugs on DNA.
Plenum publishing cooperation
- Proc. of the conference of the New York of Science, (1977)
The uses of liposomes in biology and medicine.
- Puisieux, F., Benita, S., (1982)
Towards a new galenic dosage form the liposomes.
Biomed. Pharmacother. 36 : 4 - 13

- Raettig, H., (1976)
Aktivitätssteigerung von Alveolarmakrophagen bei der
Maus nach Inhalationsimpfung mit IRS-19.
Krankenhausarzt 49 : 230
- Ralston, E., Hjelmeland, L.M., Klausner, R.D.,
Weinstein, J.N., Blumenthal, R., (1981)
Carboxyfluorescein as a probe for liposome - cell
interactions: effect of impurities, and purification of
the dye.
Biochim. Biophys. Acta 649 : 133
- Raz, A., Bucana C., Fogler, W.E., Poste, G., Fidler, I.J.
(1981)
Biochemical, morphological, and ultrastructural
studies on the uptake of liposomes by murine
macrophages.
Cancer Res. 41 (2) 487 - 494
- Roden, V., Goldin, S.M., (1979)
Formation of unilamellar lipid vesicles of controllable
dimensions by detergent dialysis.
Biochemistry Vol. 18, No. 19 : 4173 - 4176
- Rolle, M., Mayr, A., (1984)
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart : 47 - 49
- Rosemann, M., Litmann, B.J., Tompson, T.E., (1975)
Transbilayer exchange of phosphatidylethanolamine for
phosphatidylcholine and N - acetimidoylphosphatidyl-
ethanolamine in single - walled bilayer vesicles.
Biochemistry 14 : 4826 - 4830
- Rosen, H., Klebanoff, S.J., (1977)
Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase -
mediated antimicrobial system.
J. Biol. Chem. 252 : 4803 - 4810
- Rothmann, J. E., Dawidowics, E.A., (1975)
Asymetric exchange of vesicle phospholipids catalyzed
by the phosphatidylcholine exchange proteins. Measurement
of inside - outside transitions.
Biochemistry 14, 2809 - 2816

- Roth, J.A., Kaeberle, M.L., (1981)
Evaluation of bovine polymorphonuclear leucocyte function.
Vet. Imm. Immunopath. 2 : 157 - 174
- Schroit, A.J., Fidler, I.J., (1982)
Effects of liposome structure and lipid composition on the activation of the tumoricidal properties of macrophages by liposomes containing muramyl dipeptide.
Cancer Res. 42 (1) : 161 - 167
- Schwendener, R.A., Lagocki, R.A., Rahman, Y.E., (1984)
The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages.
Biochim. Biophys. Acta 772 (1) : 93 - 101
- Sessa, G., Weissmann, G., (1968)
Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes.
J. Lipid. Res. 9 : 310 - 318
- Sharom, F.J., Barratt, D.G., Ihede, A.E., Grant, C.W.M., (1976)
Glycolipids in model membranes. Spin label and freeze - etch studies.
Biochim, Biophys, Acta 455 : 485 - 492
- Silverstein, S.C., Steinmann, R.M., Cohn, Z.A., (1977)
Endozytosis
Anun Rev. Biochem. 46 : 669
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., (1972) •
The fluid mosaic model of the structur of cell membranes. Cell membranes are viewed as twodimensional solutions of oriented globular proteins and lipids.
Science 175 : 720 - 731
- Small, D.M., (1967)
Phase equilibria and structure of dry and hydrated egg lecithin.
J. Lipid Res. 8 : 551 - 557

- Smith, G.S., Lumsden, J.H., (1982)
 Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing.
 In: Advances in veterinary immunology
 Developments in animal and veterinary sciences 12
 Elsevier Scientific Publ. Comp. Amsterdam
- Stoffel, W., (1969)
 Grundlagen der pharmakologischen Beeinflussung von Biomembranen. Zur Feinstruktur von Membranen der tierischen Zelle.
 Arzneimittelforschung 19 : 253 - 259
- Strickland, K.P., (1973)
 The chemistry of phospholipids. In: form and function of phospholipids, G.B. Ansell, R.M.C. Dawson, J.N. Hawthorne (eds). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 9 - 42
- Stünzi, H., Weiss, E., (1987)
 Allgemeine Pathologie.
 Paul Parey Berlin, Hamburg
- Sun, S.T., Hsang, C.C., Day, E.P., Ho, J.I. (1979)
 Fusion of phosphatidylserine and mixed phosphatidylserine - phosphatidylcholine vesicles - dependence on calcium concentration and temperature.
 Biochemica et Biophysica Acta 557 : 45 - 52
- Szejda, P., Parce, J.W., Seeds, M.S., Bass, D.A., (1984)
 Flow cytometric quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis.
 J. Imm. 133 : 3303 - 3307
- Szoka, F., Papahadjopoulos, D., (1978)
 Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse - phase evaporation.
 Natl. Acad. Sci. 75 : 4194 - 4198
- Territo, C.M., Golde, D.W., (1979)
 The function of human alveolar macrophages.
 J. of. Ret. endo. Soc. 25 : 111 - 113

- Thiele, O.W., (1979)
Lipide Isoprenoide mit Steroiden.
Thieme Stuttgart : 374 - 376
- Träuble, H., Grell, E., (1971)
The formation of asymmetrical spherical lecithin vesicles.
Neurosciences Res. Prog. Bull. Vol. 9, No. 3 : 373
- Tsan, M.F., (1977)
Stimulation of the hexose monophosphate shunt independent of hydrogen peroxide and superoxide production in rabbit alveolar macrophages during phagocytosis.
Blood 50 (5) : 935 - 945
- Vorlaender, K.O., (1983)
Immunologie
Georg - Thieme, Stuttgart, New York.
- Weinstein, J.N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R., Hagens, W.A., (1977)
Liposome - cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker.
Science 195 : 489
- Wilshut, J., Düzgünes, N., Papahadjopoulos, D., (1981)
Calcium / magnesium specificity in membrane fusion: kinetics of aggregation and fusion of phosphatidylserine vesicles and the role of bilayer curvature.
Biochemistry 20 : 3126 - 3133
- Zglicynsky, J.M., Olszowska, E., Olszowsky, S., Stelmaszynska, T., Kwasnowska, E., (1985)
A possible origin of chemiluminescence in phagocytosing neutrophils. Reaction between chloramines and H2O2.
Int. J. Bioch. 17 : 515 - 519
- Zwaal, R.F.A., Demel, R.A., Roelofsen, B., van Deenen, L.L.M., (1976)
The lipid bilayer concept of all membranes.
Tibs 1 : 112 - 114

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. R. Schubert möchte ich für die allzeit freundliche wissenschaftliche Betreuung, die Einführung in die Liposomenpräparation, sowie die Unterstützung beim Fertigstellen dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. h.c. mult. A. Mayr, Vorstand des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Übernahme dieser Arbeit.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schmidt möchte ich für das nette Arbeitsklima danken. Mein besonderer Dank gilt hierbei all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn R. Storf danke ich für Diskussionsbereitschaft und freundliche Unterstützung.

Meiner Frau danke ich für die große Geduld bei der Abschrift und Überarbeitung des Manuskripts.

Meinem Leehrtierarzt Dr. med. vet. K. Fegert möchte ich für die Überlassung gelegentlicher Praxistätigkeiten während der Promotion danken.

Herrn und Frau Bozler möchte ich an dieser Stelle dafür danken, daß sie mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

Lebenslauf

- 1961 geboren am 24. März in Tübingen als Sohn der Eheleute Ernst Rempfer und Rosa Rempfer, geb. Nill
- 1967 Besuch der Grund- und Hauptschule in Bodelshausen
- 1973 Übertritt in die Realschule Haigerloch
- 1975 Wechsel auf das Gymnasium in Hechingen
- 1981 Im Juni Abitur
- 1981 Ersatzdienst im Diasporahaus Bietenhausen
- 1982 Im Wintersemester Studienbeginn an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 1987 Im November Staatsexamen und Beginn der vorliegenden Dissertation
Im Dezember Eheschließung
- 1988 Im Februar Approbation als Tierarzt

